الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université
Dr.Yahia FARES de MEDEA

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

جامعة الدكتور يحي فارس بالمدية

FACULTE DES SCIENCES

Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Projet de fin d'étude en vue de l'obtention du Diplôme de Master
Sciences de la Nature et de la Vie

Spécialité : **Microbiologie Appliquée**

Thème

L'effet de PGPR d'orge sur la croissance de la luzerne dans l conditions de stress abiotique.

Présenté par :

DEBIEB Amel et **BELLATRECHE Imene**

Soutenu publiquement le 19/06/2018. Devant le jury composé de :

Président **Mr NASRI R MAB (Université Y.F, Médéa)**

Encadreur **Mme BOUHERAMA A MAB (Université Y.F, Médéa)**

Examinateur **Mr RAHAL M MAB (Université Y.F,Médéa**

Examinateur **Mr ACHEK R MAB (Université Y.F, Médéa)**

Promotion : 2017/2018

Résumé

Dans le cadre d'une étude qui porte sur l'analyse qualitative et quantitative de la microflore rhizosphérique cultivable associée à l'orge (*Hordeum vulgarea* L.) cultivé dans la région d'El Goléa-Ghardaia (zone saharienne).

Nous avons jugé intéresssant d'analyser la densité et la diversité de la microflore bactérienne et les caractériser sur le plan morphologique, physiologique et biochimique et pour séléctionner une communauté microbienne possédant un pouvoir PGPR et une résistance aux conditions de stress abiotic et de les utilisé comme inoculum pour tester leurs effet sur la croissance et le développement de *Medicago sativa* L. dans les conditions de stress.

Nos résultats ont montré une grande diversité et densité des populations bactériennes, les isolats obtenus ont montré des bonnes critéres pour le rends un bon inoculum pour le développement des plantes dans les conditions de déficit hydrique et salin.

Un effet positif de nos isolats a été montré sur les plantules de la luzerne dans des conditions de stress salin et hydrique sur la germination, la croissance des plantules et la tolérance à des niveaux élevées de stress.

Mots clé: Medicago sativa L, Rhizosphère , PGPR. Stress hydrique , Stress salin.

ملخص

في إطار دراسة تركز على التحليل النوعي و الكمي للبكتيريا المعزولة من ريسوزفير نبتة الشعير المعزولة من القولية -غرداية (منطقة صحراوية)وجدنا انه من المثير للإهتمام العمل على تحليل كثافة و توزع الميكروبات البكتيرية و دراسة خصائصها المورفولوجية ، الفيسيولوجية و البيوكيميائية من أجل اختيار مجتمع ميكروبي يمتلك القدرة PGPR و تحمل الشروط غير الحيوية لاستخدامها كلقاح لاختبار تأثيرها على نمو و تطور نبيتة البرسيم تحت شروط الإجهاد.

أظهرت النتائج التي توصلنا إليها تنوعًا وكثافةً كبيرةً في أعداد البكتيريا ، أظهرت العزلات التي تم الحصول عليها معايير جيدة لجعلها لقاحًا جيدًا لتطوير النباتات في ظروف الإجهاد المائي و الملحي.

تأثير إيجابي لعزلنا ظهر على شتلات البرسيم في ظروف الضغط الملحي والمائي على الإنبات ونمو الشتلات والتسامح مع مستويات عالية من الإجهاد.

الكلمات المفتاحية: البرسيم الحجازي ريزوسفير ،PGPR ، الإجهاد المائي ، الإجهاد الملحي.

Summary

As part of a study on the qualitative and quantitative analysis of the cultivable rhizosphere microflora associated with barley (Hordeum vulgarea L.) grown in the region of El Goléa-Ghardaia (Saharan zone).

We found it interesting to analyze the density and diversity of the bacterial microflora and to characterize them morphologically, physiologically and biochemically, in order to select a microbial community with PGPR pwer and resistance to abtiotic stress conditions. And for using as an inoculum to test their effect on the growth and development of Medicago sativa L. under salt and water stress conditions.

That Our results showed a great diversity and density of bacterial populations, the isolates obtained showed good criteria to make it a good inoculum for the development of plants in conditions of water and salt deficit.

A positive effect of our isolates was shown on alfalfa seedlings under conditions of salt and water stress on germination, seedling growth and tolerance to high levels of stress.

Key words: MedicagosativaL, Rhizosphere, , PGPR, Salt stress, Water stress.

Dédicace

Je dédice ce modeste de travail à mes chers parents, pourtous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs priéres tout au long de les études.

A mes chéres sœurs Bahia, Meriem , Batoul et mon chére frére Mouhamed-Amine pour leurs encouragement permanents, et leur soutien moral.

A toute ma famille pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire.

A tous mes collégues de la promotion 2017/2018.

A tous mes amis(e) de travaille.

Amel

Dédicaces

Au nom d'ALLAH clément et
Miséricordieux et que le salut de DIEU soit sur son
prophète MOHAMED

A mon père *Qui a œuvré pendant des années à notre bien être et qui a Consenti de bien lourds efforts pour nous permettre de mener à bien nos études. Je tiens à lui témoigner ma profonde affection*

A ma Mère

Son soutien tout au long de mes études
sa bienveillance et ses conseils ont été très précieux, je tiens à lui témoigner ma profonde affection et reconnaissance

A mes frères Sidaàli et Mohamed
A mes sœurs Akila,Amina et Soumia

A qui je témoigne ma profonde affection, toujours présent, ils m`ont toujours assisté et cru en moi

A mon âme sœur
A mon beau-frère Hicham
A mes neveux Mohamed et Abd allah
A ma chère nièce Rania
A mes amies :Amel,Djazia ,Assia et maroua

Qui m`ont toujours entouré et soutenu.

A ma grande famille BELLATRECHE

IMENE

REMERCIEMENTS

En préambule à ce mémoire nous remerciant ALLAH qui nous aide et nous donne la patience et le courage durant ces langues années d'étude.

Ce mémoire n'aurait pas été possible sans l'intervention, consciente, d'un grand nombre de personnes. La première personne que nous tenons à remercier est notre encadrante **Mme BOUHRAMA A** pour l'orientation, la confiance, la patience qui ont constitué un apport considérable sans lequel ce travail n'aurait pas être mené au bon port. Qu'il trouve dans ce travail un hommage vivant à sa haute personnalité.

A monsieur « NASRI R » qui nous fait l honneur de bien vouloir présider notre jury.

A nos examinateurs : **« Mr RAHAL M »** et **« Mr ACHEK R »** pour avoir accepté de juger notre mémoire.

Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements à tous les professeurs qui nous ont enseigné et qui par leur compétence nous ont soutenu dans la poursuite de nos études.

Enfin, on remercie tous ceux qui, de prés ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail.

Table des matières

Résumé
Remerciements
Liste des abréviations

Table des matières
Introduction……1

Partie I : Rappel Bibliographiques

Chapitre I. Les zones arides 2

1. Les sols 3

2. Les microorganismes des sols des zones arides 3

Chapitre II. Le stress salin et hydrique 8

1. Stress salin 9

1.1. Définition 9

1.2. Types de salinité 10

1.3- principaux sels solubles 10

1.4. Effets de salinité 10

1.4.1. Germination 11

1.4.2. Morphologie 11

1.4.3 Physiologie et la Biochimie 12

1.5. Tolérance des plantes au stress salin 13

1.6 Tolérance des céréales à la salinité 15

1.7 Réponse et la stratégie adaptative de la plante aux stress salin 15

1.8 Atténuation du stress salin dans les plantes par les PGPR 16

2. Déficit hydrique 18

2.1. Définition 18

2.2. Les effets du déficit hydrique 18

2.3. Stratégies de résistance au déficit hydrique 19

2.3.1. L'échappement 19

2.3.2. L'évitement 19

2.3.3. La tolérance 19

Chapitre III. Les bactéries rhizosphériques promotrices de croissance des plantes 20

1. Définition et structure de la rhizosphère 20

2. Les bactéries rhizosphériques promotrices de croissance des plantes 21

2.1 Définition d'une communauté bactérienne 21

3.Composition des communautés bactériennes rhizosphérique 22
3.1. Les bactéries stimulatrices de croissance..... 22
4. Bactéries protectrices contre les agents phytopathogènes 26
4.1. Les mécanismes de protection 26
Interactions directes Bactéries/Pathogène 27
1. Compétition pour l´espace et les nutriments..... 27
2. Antibiose..... 27
Interactions indirectes Bactéries/Plante..... 28
Partie II : Matériels et méthodes
Chapitre I. Matériel..... 31
1. Matériel non biologique..... 31
2. Matériel biologique..... 31
Chapitre II. Méthodes 33
1. Analyse moléculaire de la diversité des communautés bactérienne rhizosphérique associées à l'orge 33
1.1. Extraction et isolement d'ADN 33
1.2. Analyse quantitative de l'ADN 33
1.3. Analyse qualitative de l'ADN 33
1.4. Séquençage à haut débit..... 33
1.5. Analyse bio-informatique et statistique 34
2. Etude de la microflore bactérienne cultivable rhizosphérique d'orge 34
2.1. Dénombrement de la microflore bactérienne totale..... 34
2.2. Isolement et purification de la microflore bactérienne 34
2.3. Recherche de l'activité PGPR chez les souches isolées..... 34
2.4.Caractérisation..... 36
3. Effet de l'inoculation des bactéries P.G.P.R. sur la morphologie et le développement des plantes38
3.1. Mise en place de l'expérimentation..... 38
- Stérilisation des graines..... 38
- Préparation d'inoculum 38
- Inoculation des graines..... 39
- Application de stress..... 39
3.2. Mesure de l'effet de l'inoculation sur la croissance des plantes..... 39
Partie III : résultats et discutions

Chapitre I .Analyse métagénomique de la microflore bactérienne rhizosphérique 40

Chapitre II .Analyse de la composition de la microflore bactérienne cultivable rhizosphérique de l'orge44

1. Caractérisation fonctionnelle des bactéries rhizosphérique 44

1.1. Fixation d'azote 44

1.2. Solubilisation des phosphates 45

1.3. Production de sidérophores 48

1.4. Production d'acide cyanhydrique 49

1.5. Production d'acide indole acétique 50

2. Caractérisation phénotypique 51

2.1 Étude microscopique 51

2.2. Caractérisation physiologique 52

3. Effet de l'inoculation des bactéries P.G.P.R. sur la morphologie et le développement des plantes de la luzerne 59

3.1. Germination et croissance 59

3.2. Paramètres biométriques 60

3.3 Paramètres biochmiques 63

Conclusion 66

References bibliographiques
Annexes
Liste des figures
Liste des tableaux

Liste des abréviations

C ° : Degrés Celsius
CAS : ChromAsurolS
EPS :Exopolysaccharides
Fe3+ : L'ion fer III
H :hydrogène
Ha :hectare
HCl : L'acide chlorhydrique
KCl : chlorure de potassium
KOH : L'hydroxyde de potassium
mg : milligramme
mM : milli Mol
ml: millilitre
N : Azote
Na Cl : Chlorure de sodium
P : phosphore
PGPR : Plant Growth Promoting Rhizobacteria
PEG : polyéthylène glycol
pH : potentiel Hydrogène
TSA : Trypticasesoy agar
UFC : Unité Formant Colonie
µm. : micrométre

Depuis l'indépendance, l'Algérie a mis en œuvre plusieurs programmes de développement du secteur agricole, qui n'ont pas atteint les résultats escomptés et ont favorisé l'émergence d'une dépendance alimentaire considérable vis-à-vis des marchés extérieurs.

Sous une pression sociale d'une demande alimentaire forte et pour enrayer le déficit structurel algérien en céréale, les pouvoirs ont été orientés vers le Sahara, une région désertique immense qui couvre une superficie de plus de deux millions de Km^2, caractérisée par un climat aride, une température élevée, des précipitations peu abondantes et irrégulières, une forte évaporation et une faible humidité de l'air. Cependant elle dispose d'une richesse en ressources hydriques importants constitués en majorité de réserves d'eau souterraine non renouvelable, ce qui rend l'activité agricole assez complexe et conditionnée impérativement par la disponibilité en eau et la possibilité d'utilisation dans le temps.

L'agriculture en zones sahariennes constitue une source de revenus, un facteur de stabilité et un moyen de fixation des populations locales mais souffre de problèmes de gestion rationnelle et durable sans modification physique, chimique et biologique de l'environnement.

Le développement d'une agriculture saharienne ne se limite pas à étendre les superficies à irriguer ou à augmenter le débit soutrrait à partir des forages, mais surtout d'améliorer la productivité agricole et son appareil de production, les techniques d'aménagement et d'exploitation hydro-agricole, qui sont aujourd'hui une nécessité d'assurer un développement harmonieux et durable, et ce pour une agriculture moderne et performante.

L'un des moyens les plus prometteurs pour améliorer la productivité et réduire les coûts des produits agricoles, consisterait dans l'utilisation des microorganismes vivants comme inoculum. De meilleures connaissances des mécanismes d'interaction plantes-microorganismes permettent de favoriser des populations déjà présentes dans la rhizosphère et qui sont bénéfiques pour les plantes, et de développer des pratiques autres que l'utilisation d'inoculants chimiques.

Dans le cadre d'une étude qui porte sur l'effet des bactéries isolés à partir de la rhizosphère d'orge sur la croissance et le développement d'une plante fouragère *Medicago sativa* L. nous avons jugé intéresssant de :

Analyses la densité et la diversité de la microflore bactérieen rhizosphérique d'orge

Obtention d'un ensemble de bactéries cultivables et les caractériser sur le plan morphologique, physiologique et biochimique

Tester les bactéries à pouvoir PGPR sur la croissance et le développement de *Medicago sativa* L. dans les conditions de stress salin et hydrique

I. Les zones arides

La zone aride est caractérisée à la fois par son climat toujours peu pluvieux, et parfois très sec, et très irrégulier, et par sa végétation herbacée, rarement arborée. Elle est subdivisée en zone désertique (hyper aride) dont la pluviométrie est inférieure à 100 mm , zone aride proprement dite dont la pluviométrie est comprise entre 100 et 300- 400 mm et zone subaride (semi aride) dont la pluviométrie est comprise entre 300- 400 mm et 600 mm., en fonction des conditions climatiques et des caractères de la végétation, à chacune d'elles correspondent des sols typiques (Aubert, 1960). L'aridité ne doit pas être confondue avec la sécheresse, concept météorologique à référence temporelle- phénomène conjoncturel (période, année sèche). L'aridité à de fortes implications hydrologiques, géomorphologique et édaphiques dont elle est indissociable (Aggoussine, 2003).

1. Les sols

Les sols des régions arides présentent un certain nombre de caractères constants : évolution lente, profondeur réduite, matière organique faible, peu abondante et superficielle, structure faiblement définie, éléments minéraux assez peu altérés, colloïdes argileux stables, éléments solubles concentrés en surface ou partiellement lessivés et accumulés, à un niveau ou à un autre du profil, jusqu'à donner naissance à des nodules ou à des croûtes calcaires, gypseuses ou salines.

Les sols des zones arides peuvent être classés, selon leur teneur en matière organique et l'intensité de leur évolution, en deux groupes, les sols désertiques et sierozems.

2. Les microorganismes des sols des zones arides

Les sols des zones arides et semi-arides étaient supposés pendant longtemps, comme milieux stériles, mais les travaux d'exploration ont montrés qu'il existe des espèces microbiennes comme les bactéries, actinomycètes, champignons et algues, qui s'adaptent aux conditions climatiques extrêmes (Sasson, 1987) et ils jouent aussi un rôle fondamental dans les processus importants tel que la régulation des cycles biogéochimiques (azote, carbone, soufre,….) (Sasson, 1987).

Selon Rivkind (1969) dans les sols sahariens, la microflore totale variait entre 120 et 220 millions de germes par gramme de terre dans les sols cultivés, alors qu'elle n'était que de 28 millions germes par gramme de terre dans les sols incultes. Cependant, cette estimation de la densité des microorganismes ne concerne que les formes cultivables et qui ne représentent qu'une partie de la microflore. Une estimation réelle de la densité bactérienne des sols a confirmé que les bactéries cultivables ne représentent que 0.001% à 15% du total de la population bactérienne.

Dans les régions à environnement extrême tel que les zones arides, les microorganismes sont dans la plupart caractérisé par leur forte adaptation aux conditions climatique (froid, chaleur, manque de nutriment, salinité, aridité,….) d'où la notion de microorganismes extrêmophiles.

Le terme « extrêmophiles » a été inventé pour la première fois, en 1974, par Macelory, dans un journal intitulé '*Somecomments on the evolution of extremophiles'*, il a été interprété par plusieurs façons pour enfin être associer aux microorganismes qui peuplent des niches écologiques extrêmes caractérisées par des conditions défavorables pour le développement d'une vie (Irwin et Baird, 2004).La notion d'extrêmophilie est différente de celle de la résistance aux conditions extrêmes, elle implique que les cellules se développent et fonctionnent de manière optimale dans ces conditions (Alber et *al*., 2001).

Les microorganismes extrêmophiles peuvent être répertoriés en plusieurs groupes, selon leurs paramètres de croissance et les conditions dans lesquelles ils existent (hautes et basses températures, valeurs extrêmes de pH, hautes concentrations de sel et hautes pressions) (Alber et *al*., 2001).

- **Les microorganismes halotolérants et halophiles**

Les microorganismes qui peuvent vivre en présence de sel sont les halophiles et les halotolérantes .les halophiles sont les bactéries nécessitant la présence de sel (NaCl) dans le milieu pour leur croissance (Tiquia et *al*., 2007). Les microorganisme nécessitant moins de 2% de sel pour une croissance optimale ne sont pas considérés comme halophiles (Ollivier et *al*., 1994). En revanche, les halotolérantes sont les bactéries capables de se développer sans sel tout en tolérant des concentrations élevées en sel (Echigo et *al*., 2005) par exemple l'espèce *Halobacillus salinus* qui a été isolée à partir d'un lac salé, cette espèce se développe sans sel et dans des milieux contenant plus de 23% de NaCl (Yoon et *al*., 2003).

Une diversité considérable existe également dans les mécanismes d'adaptation des microorganismes halophiles et halotolérants à la forte pression osmotique exercée par leur milieu environnant fortement salin. Comme les membranes biologiques sont perméables pour l'eau, tous les microorganismes doivent maintenir leur cytoplasme au moins isoosmotique avec leur environnement (Oren, 1999). Parmi les stratégies adoptées par ces derniers, deux sont les plus généralisées ; il s'agit de l'accumulation de KCl et l'accumulation de solutés compatibles.

L'accumulation de KCL implique l'accumulation des ions K^+ et Cl^- pour maintenir l'équilibre osmotique. Elle est adoptée par les bactéries halophiles appartenant à l'ordre des

Halobacteriales et Halanaerobiales. Cependant, la présence intracellulaire de concentrations élevées de KCl exige une adaptation supplémentaire des machineries enzymatiques, aussi les protéines devraient maintenir leur activité et leur conformation appropriées (Lanyi, 1974).

Accumulation de solutés compatibles consiste à exclure le sel du cytoplasme, et à accumuler des solutés organiques pour assurer l'équilibre osmotique. Elle est adoptée par les membres du domaine *Bacteria*. Il existe une large variété de solutés compatibles à savoir le glycérol, les sucres alcools, la glycine bétaïne, l'ectoïne et son dérivé 5-hydroxy, les sucres simples, etc. (Galinski, 1995).Ces composés sont synthétisés par l'organisme ou importés de l'environnement externe sans interférer avec son métabolisme. Plusieurs études (Bursy*et al*., 2008;Vargas *et al.*, 2008) ont prouvé que les osmolytes tels que les ectoïnes protègent l'organisme de différents stress (thermique et salin).

- **Les microorganismes thermophile et hyper thermophile**

Une définition plus pratique et plus large a été proposée par Karl Stetter (1981), qui qualifiée d'organismes thermophiles, tous les êtres vivants se développant à des températures supérieures à 45°C. Cette dernière définition est intéressante car elle définit 3 sous catégories au sein des thermophiles :

Les thermophiles modérés (55 et 65°C), les thermophiles extrêmes (65 et 80°C) et les hyperthermophiles dont la température optimale de croissance à des températures comprises entre 80 et 110°C (Madigan et Martino, 2006).

Les hyperthermophiles les plus extrêmes sont des bactéries du genre *Thermotogamaritima sp.* et *Aquifexpyrophilus sp.* qui peuvent croitre à des températures de 90°C et 95°C respectivement (Niehaus et *al*., 1999).

La base moléculaire pour l'adaptation à ces environnements extrêmes a été étudiée de manière plus intensive pour les microorganismes vivant dans les milieux à hautes températures que pour tout autre paramètre. À des températures élevées, des biomolécules, telles que les enzymes se dénaturent et perdent leur fonction et, par conséquent, l'arrêt du métabolisme. En outre, la fluidité des membranes augmente de façon significative, ce qui perturbe la cellule.

Pour éviter la dénaturation et la dégradation, les thermophiles présentent une variété d'adaptations cellulaires. Leurs lipides membranaires contiennent des acides gras saturés et linéaires ce qui n'est pas le cas pour les mésophiles. Cela permet aux thermophiles de croître à des températures plus élevées en fournissant le bon degré de fluidité nécessaire pour le fonctionnement des membranes (Ulrih et *al* ., 2009).

- **Les microorganismes psychrophiles**

Le terme Psychrophiles est réservé pour les microorganismes qui peuvent se développer de façon optimale à des températures inférieures ou égales à 15 °C avec un maximum de croissance à 20°C, et sont incapables de croître au-dessus de 20 ° C (Irwin et Baird, 2004). Les habitats des microorganismes psychrophiles comprend les régions polaires où la lumière disparaît tout près de trois mois par année, où les ressources nutritives ne sont présentes qu'en faible quantité et où la température descend parfois à des niveaux incroyablement bas, et les eaux glacières (Irwin et Baird, 2004).

Comme exemples de microorganismes psychrophiles, les genres *Psychrobacter sp.*,*Arthrobacter sp.* et certaines espèces des genres *Pseudomonas, Bacillus, Halomonas, Methanogenium, Micrococcus, Sphingomonas, Hyphomonas, Polaribacter, Psychroserpens, Polaromonas* et *Vibrio* (Satyanarayana et *al*., 2005).

Toute baisse de température d'un micro-organisme par rapport à sa température physiologique entraine une surexpression de protéines dites «cold-shock» (Csps). Ces protéines sont impliquées dans plusieurs processus cellulaires tels que l'expression génétique et la régulation de la fluidité membranaire (Phadtare, 2004).

Les protéines «cold-shock» psychrophiles et thermophiles restent très peu étudiées en comparaison de leurs homologues mésophiles. Cependant certaines études notent plusieurs similarités entre les protéines psychrophiles et mésophiles notamment les séquences d'ADN (Collins et *al*., 2006b; D'Amico et *al*., 2006; Tosco et *al*., 2003) et la présence de protéines spécifiques du froid produites lors d'une exposition prolongée aux basses températures, les Caps,« Cold acclimation proteins», le rôle des Caps serait le maintien de la fluidité membranaire et/ ou le remplacement des peptides dénaturés (Phadtare, 2004).

Les protéines d'antigel (AFP) présentes chez certains vertébrés, plantes, mycètes et bactéries (*Marimonasprimoryensis*) permettent la survie à des températures inférieures à 0°C en se fixant sur des petits cristaux de glace inhibant ainsi la croissance et la recristallisation de la glace (D'Amico et al., 2006). Des molécules protectrices comme le tréhalose, le glycérol et le sorbitol produits par les psychrophiles protègent les structures cellulaires et assurent une osmolarité cellulaire optimale pour faire face à la déshydratation et la dénaturation des protéines (D'Amico et al., 2006; Kawahara, 2008; Sabri, 2001) et le maintien de l'activité enzymatique *in vivo* (Kawahara, 2008).

- **Les microorganismes acidophiles**

Les microorganismes acidophiles se développent de façon optimale à un pH égal à 2 (Morozkina et *al*., 2010), ils colonisent des environnements acides alors que les acido-tolérants peuvent être isolés à partir des environnements à pH neutre (Horikoshi, 1999).

Les acidophiles existent dans les trois domaines de la vie (Baker-Austin et Dopson, 2007), certains acidophiles possèdent des mécanismes qui leurs permettent de faire ressortir les protons intracellulaires pour garder le pH de leur cytoplasme proche de la neutralité donc leur protéines intracellulaires ne nécessitent pas de développer des mécanismes pour le maintien de leur stabilité alors que d'autres acidophiles, tel que *Acetobacteraceti*, ont un cytoplasme acide et possèdent des mécanismes qui expulsent les protéines intracellulaires à l'extérieur pour atteindre leur stabilité (Menzel et Gottschalk, 1985).

- **Les microorganismes alcalophiles**

Les microorganismes alcalophiles sont ceux qui se développent à des valeurs de pH égales ou supérieures à 9 avec un optimum entre 10 et 12, tout en montrant une croissance très faible près de la neutralité. Ces microorganismes ne se trouvent pas seulement dans des habitats à pH neutre ou alcalin, mais ils peuvent exister aussi dans des habitats acides (Horikoshi, 1999).

La réponse des microorganismes, en particulier les alcalotolérants, à des pH alcalins nécessite la présence intracellulaire des ions de Sodium pour la régulation et le métabolisme (Lewinson et *al*., 2004). Ce mécanisme d'échange proton/ ion fait intervenir une pompe protomotrice qui va rejeter les ions Na^+ hors de la cellule et en fessant entré les protons H^+ par la chaine respiratoire (Sarsengalievich., 2010).

- **Les microorganismes piézophiles (barophiles)**

Zobell et Morita (1957) ont été parmi les premiers à tenter d'isoler les micro-organismes adaptés à croître sous des pressions élevées, et ils les ont appelé des barophites.

Les premières bactéries barophiles ont été isolées en 1979, elles sont définies comme celles ayant une croissance optimale à des pressions supérieures à 40 MPa (mégapascal), alors que les bactéries barotolérantes présentent une croissance optimale à une pression inférieure à 40 MPa et poussent bien à la pression atmosphérique (Yayanos et *al*., 1979).

Le terme piézophile (en Grec piezo = pression et philo = aimer) a été introduit officiellement en 1995 pour décrire les microorganismes barophiles en comparaison avec d'autres termes similaires utilisés pour décrire l'effet de la pression dans d'autres domaines tel que la piézoélectrique (Yayanos, 1995). Parmi les genres représentants des piézophiles, il y en a *Shewanella*, *Colwellia*, *Moritella*, *Methanococcus*, *Pyrococcus*et *Thermus*(Abe et Horikoshi, 2001).

La pression est un paramètre qui peut influencer l'activité microbienne et qui est étudié depuis le milieu du 20ème siècle. En 1979, la première souche de bactérie (souche CNPT-3) adaptée à la pression a été isolée par (Yayanos et al. 1979).

Aujourd'hui, l'amélioration de l'échantillonnage et l'instrumentation en laboratoire permettent d'étudier les processus moléculaires liés à la croissance et à la survie des microorganismes dans les océans profonds (Allens and Bartlett, 2010).
L'effet de la pression sur la membrane cellulaire, les protéines et l'expression des gènes sont étudiés en détail chez ces organismes.
Les faibles températures et les pressions élevées diminuent la fluidité membranaire et affectent les processus associés à la membrane comme les flux d'ions et des éléments nutritifs et associés à la réplication d'ADN (Bartlett, 1992).
Il a été montré que plusieurs microorganismes supportant ou vivant à des pressions élevées synthétisent des acides gras polyinsaturés dans leur membrane cellulaire tels que l'acide eicosapentaenoïque et l'acide docosahexaénoïque qui permettent de conserver la structure et la perméabilité de la membrane cellulaire à basse température et/ou haute pression (Kamimura et al.,1993 ;Fang et al., 2000). La pression hydrostatique influe également sur l'abondance des protéines de surface cellulaire. Une bactérie modérément barophiles, Photobacterium SS9 régule l'abondance de protéines (OMP) sur leur membrane externe en réponse à la pression hydrostatique (Chi et Bartlett, 1993).
D'autres du genre Shewanellaspp. possèdent un opéron régulé par la pression (Nakasone et al.,1998).

II. Le stress salin et hydrique

Le mot stress a été apparu autour de 1940. Il s'agissait d'un mot anglais, employé en mécanique et en physique, qui voulait dire « force, poids, tension, charge ou effort ». En biologie, le stress est définit comme étant l'ensemble de conditions qui provoquent des changements de processus physiologique résultant éventuellement en dégâts ; dommages, blessures, inhibition de croissance ou de développement (Oliveira et al.,2013). La notion de stress implique d'un part une déviation plus ou moins brusque par rapport aux conditions normales de la plante ou de l'animal et d'autre part une réaction sensible de l'individu dans les différents aspects de sa physiologie, qui change sensiblement soit avec une adaptation à la nouvelle situation, ou à la limite une dégradation menant à une issue fatal (Yadav et al., 2011).

Le stress peut être subdivisé selon son origine en deux grandes catégories :

- **Stress biotique** : imposé par les organismes (insectes-herbivores,….).
- **Stress abiotique** : provoqué par un défaut ou excès de l'environnement physiquo-chimique comme la sécheresse, les températures, la salinité,…..

1. Stress salin

1.1. Définition

Le stress salin ou la salinité peut être définie comme étant la quantité globale des sels hydrosolubles dans le sol (Imalet, 1979), il s'agit de : le Potassium, le Magnésium, le Calcium, le Chlorure, le Sulfate, le Carbonate, le Bicarbonate et le Sodium.

La salinité constitue l'un des facteurs abiotiques les plus répandus au niveau de la planète et qui limite fortement les rendements agricoles, notamment dans les régions arides et de semi arides, où les précipitations sont limitées et ne sont pas suffisantes pour transporter les sels du profil racinaire des plantes (Khales et Baaziz ,2006 et Schulze et *al.*,2005).

La salinité se produit par une salinisation. C'est un processus d'enrichissement du sol en sels solubles qui aboutit à la formation d'un sol salin (Keren, 2000 ; Levy, 2000 ; Brady et Weil, 2002 et Essington, 2004). D'après Mermoud (2006), la salinisation des sols est le processus d'accumulation des sels à la surface du sol et plus particulièrement dans la zone racinaire, elle se solde par des effets nocifs sur les végétaux et le sol.

1.2. Types de salinité

Selon l'origine de la salinité d'un sol, deux types de salinité sont distingués.

- ✓ **Salinité primaire**

La salinité primaire résulte de l'accumulation des sels dans le sol à travers un long processus naturel de dégradation des roches salines et des apports éoliens des sels des mers et océans.

- ✓ **Salinité secondaire**

Près de 20% des terres salinisées ont une origine humaine ou anthropique ; cette salinisation est qualifiée de «secondaire» dû principalement à l'irrigation des terres avec une eau de mauvaise qualité (eau saline), un lessivage insuffisant et un drainage défaillant (Anonyme, 2006 et Le goupil, 1974).

1.3- principaux sels solubles

Les principaux sels solubles qui participent dans la formation des sols salés sont :

- **Les carbonates** : les plus rencontrés sont le carbonate de sodium (Na2CO3), bicarbonate de sodium (Na HCO3), carbonate de calcium (CaCO3) et le carbonate de magnésium (mgCO3).
- **Les sulfates** : ce sont les sels de l'acide sulfurique et les plus fréquents sont: le sulfate de magnésium (MgSO4), sulfate de sodium (NaSO4) et le sulfate de calcium (Ca SO4).
- **Les chlorures** : principalement : le chlorure de sodium (NaCl), le chlorure de calcium (Ca Cl2) et chlorure de magnésium (MgCl2) ce sont plus soluble et forte toxicité. La présence de sels solubles en quantité importante ou d'un horizon sodique à structure dégradée, caractères qui ont une influence néfaste sur le développement de la végétation ou des cultures (Aubert, 1982)

1.4. Effets de salinité

La salinité constitue un facteur limitant non négligeable pour l'agriculture mondiale (Hillel, 2000). L'effet de la salinité se manifeste généralement chez la plupart des plantes cultivées par une réduction de la croissance et le développement (Munns et *al.*, 1983).Cet effet néfaste se traduit par des changements morphologiques, physiologiques, biochimiques et moléculaires qui affecte négativement la croissance et la productivité végétale (Ashraf et Harris, 2004).

1.4.1. Germination

La germination désigne des phénomènes par lesquelles la plantule, en vie ralentie dans la graine mure, commence une vie active et se développe grâce à l'énergie contenue dans les réserves de la graine. L'induction de la gemmation n'est possible que si certaines conditions d'environnement sont respectées (chaleur, air, humidité) et que l'embryon n'est pas en l'état de dormance.

La germination est régulée par des caractéristiques génotypiques mais aussi par les conditions environnementales et, en particulier, par la disponibilité de l'eau dans le sol (Sharma, 1973, Gutterman, 1993)(in Ndour et Danthu, 2000),

La plupart des plantes sont plus sensibles à la salinité durant leurs phases de germination et de levée (Maillard, 2001). La salinité inhibe la germination ou ralentisse sa vitesse ? ce qui expose plus les semences aux risque. (Abdelly , 2006) par son effet osmotique où elle affecte tous les processus de germination suite à la baisse du potentiel hydrique autour des graines, ce qui rend l'eau inaccessible à cette dernière pour la réhydratation et la reprise de la vie active de l'embryon (Maas et Poss, 1989).

La réduction du potentiel osmotique de la solution du sol empêche l'imbibition de la graine suite à une diminution des activités enzymatiques et une forte absorption de Na+ par rapport à K+, ce qui conduit à une toxicité embryonnaire et un retard dans les processus métaboliques (Hsiao et *al.*, 1976 ;Oertli,1976)(in Adel et Bader, 2002).

1.4.2. Morphologie

Il existe 3 effets de la salinité sur la morphologique de la plante

- **Architecture de la plante**

L'architecture de la plante est profondément modifiée sous un stress osmotique, même très modéré et ne présentant pas de symptômes flagrants. Par exemple, chez desdicotylédones comme le pois ou la vigne, le nombre de ramifications et le nombre d'organes élémentaires (phytomères) de la tige sont drastiquement réduits. Il en va de même chez les graminées, où le nombre de talles est réduit en cas d'un stress osmotique.

- **La partie aérienne**

D'après Munns et Rawson (1999), Maas et Poss (1989), l'effet de la salinité se traduit généralement par une réduction de la croissance végétative (réduction de la hauteur, nombre de talles et de feuilles) qui est en fonction de la division et l'élongation cellulaire. Elle retarde la croissance des pousses qui sont plus sensibles aux sels que les racines mais elle pousse prématurément la plante vers la maturité.

- **La partie racinaire**

La salinité affecte en particulier la croissance des racines des plantes (Läuchli et Epstein, 1990 ; Bayuelo et *al* ., 2002) ont montré qu'elle augmente le rapport PR/PA. En effet, les plantes maintiennent une croissance racinaire relativement importante sous forte contrainte saline, l'augmentation du rapport PR/PA qui s'ensuit semble être associée à une augmentation de leur tolérance au sel. Kafkai (1991), suggère que sous contrainte saline, la plante dépense plus d'énergie photosynthétique pour maintenir un statut hydrique élevé et pour la production de racines en vue de la recherche d'eau et/ou la réduction de la perte d'eau. Dans ces conditions, il semble que l'arrêt de la croissance foliaire soit déclenché par des signaux hormonaux (Munns, 2002) et qu'une part importante des photosynthètats soit alors réallouée à la croissance racinaire (figure 01). C'est l'une des réponses anatomiques clefs aux stress osmotiques chez de nombreuses espèces, dont le caractère adaptatif apparait évident puisqu'une augmentation du ratio masse des racines/masse de la canopée maximise la surface d'absorption de l'eau en diminuant la surface d'évaporation **(Munns, 2002).**

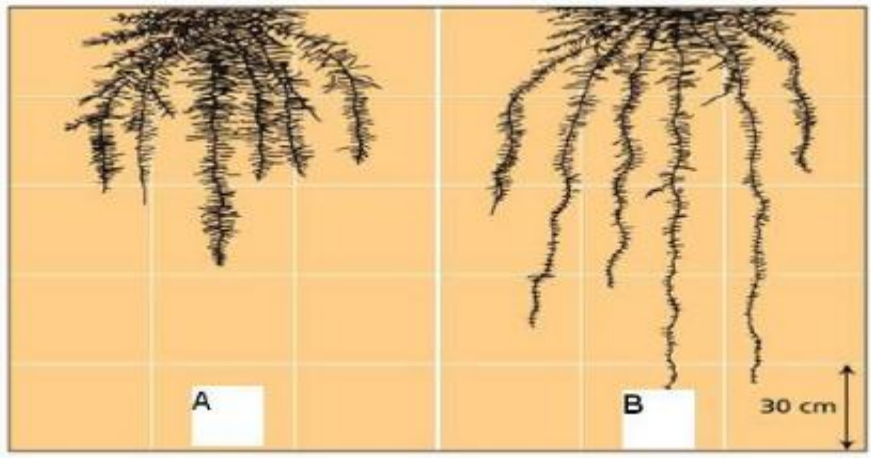


Figure 1 : Développement racinaire du blé en situation de stress (A) ou normal (B), d'après Taiz et Zeiger (2006).

1.4.3 Physiologie et la Biochimie

L'effet de la salinité sur la physiologie et la biochimie de la plante se fait sur deux paramètres ; sur les échange gazeux et la photosynthèse et sur la reproduction.

- **Les échanges gazeux et la photosynthèse**

D'après Alem et *al., (* 2002) la salinité affecte l'activité physiologique de la feuille, et plus particulièrement la photosynthèse, qui présente la cause principale de la réduction de la productivité végétale . Selon Munns (2008), la réduction de la photosynthèse est liée à la

diminution du potentiel hydrique foliaire, qui est à l'origine de la fermeture des stomates (Price et Hendry, 1991 ; Allen, 1995), qui cause la réduction de la conductance stomatique (Orcutt et Nilsen, 2000). La diffusion du CO2 à l'intérieur des stomates devient alors limitée et sa fixation au niveau des chloroplastes diminue par conséquence la régénération du RuBP (Ribulose Biphosphate) devient limitée.

La physiologie de la reproduction Selon Hu et *al.*, (2005) la salinité réduit le taux de croissance de la plante et ses organes reproducteurs. Ils ont étudié l'effet de la salinité sur la physiologie de la reproduction, ils ont constaté que le nombre du pollen dans deux différents types de cultivars de l'orge a été réduit de 24 à 37%. %. Des études réalisées par Munns et Rawson (1999), sur l'effet de l'accumulation du sel dans le méristème de l'orge sur la reproduction et le développement, montrent que les courtes périodes de stress salin pendant l'organogenèse peuvent avoir des conséquences irréversibles sur la fertilité de l'épi, elle provoque l'avortement des ovaires.

1.5. Tolérance des plantes au stress salin

La caractérisation physiologique de la tolérance des végétaux à la salinité résulte de processus qui permettent au végétal d'absorber l'eau et les sels minéraux à partir de substrats à faibles potentiels hydriques, mais aussi de vivre en acceptant la présence importante du sodium dans ses tissus; les halophytes, qui accumulent le plus de sodium (Elzam et Epstein 1969, Ruse et Epstein, 1981; et in Guerrier, 1984), se distinguent ainsi par une forte capacité d'élaboration de Composés organiques (Mercado, 1973, Briens et Larhe, 1982; in Guerrier, 1984), ces deux facteurs permettant le maintien d'une haute pression osmotique interne qui favorise les échanges d'eau entre les compartiments externe et cellulaire (Guerrier, 1984).

Munns et Tester (2008) ont établit les limites de tolérance à la salinité de espèces d'intérêt agronomique, leurs classification est déterminé selon le taux de réduction du rendement sous l'effet du sel à divers concentration mesurer en (mM) (figure 2).

Toutes les plantes ne réagissent pas de même manière face au stress salin, suivant leur production de biomasse en présence de sel, deux grandes tendances ont été discernées :

- **Halophyte :** Les halophytes sont des plantes capables de se développer et de croitre sous un régime salin de 300 mM de NaCl (Tester et Davenport, 2008).ces plantes sont capables d'accumulé le sodium dans leurs matières foliaires à des concentrations élevées. Le sodium est stockés dans les vacuoles (Glenn *et al.*, 1999), ainsi que ces plantes présentent une modification de leurs enzymes ce qui permettre une forte

adaptation à la contrainte saline (Flowers et Dalmond, 1992), ces plantes sont classées selon Levigneron *et al.* (1995) en deux catégories.

- **Les plantes de type inclusif (includer)**

La plante de type includer capte le sel, qui parvient aux feuilles de la même façon que l'eau, par le mouvement ascendant de la sève dans les vaisseaux. A l'intérieur des cellules, le sel est alors stocké dans les vacuoles (qui sont des compartiments fermés au sein de la cellule) grâce à des systèmes de "pompes" moléculaires. Le sel est ainsi isolé. (Levigneron *et al.*, 1995 ; Levitt, 1980).

- **Les plantes de type exclusif (excluder)**

La plante de type excluder empêche le sel de remonter jusqu'aux feuilles. Une première barrière existe au niveau de l'endoderme, couche interne des cellules de la racine. Cependant, cette barrière peut être interrompue, en particulier lors de l'émergence et des ramifications de la racine. D'autres mécanismes limitent le passage de sel des racines vers les feuilles (Levigneron *et al.*, 1995 ; Levitt, 1980).

- **Les glycophytes** : représentent la majorité des espèces végétales dont leur croissance est ralentie dés que la concentration des milieux externes dépasse 100 mM et devient létale à partir de 300 mM (Gereenway et Munns, 1980).

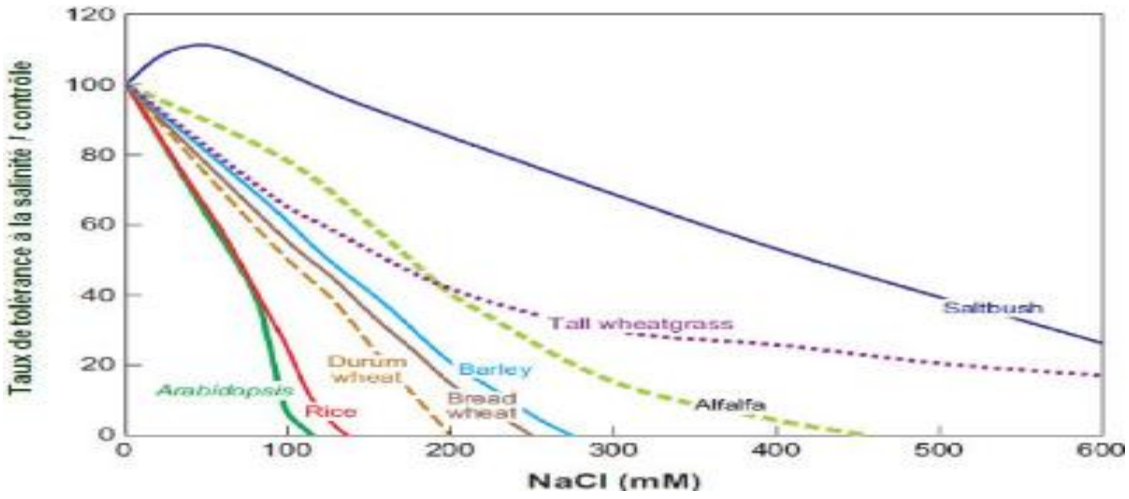


Figure 2 : Classification des plantes selon leur niveau de tolérance à la salinité en fonction de la concentration en sel (Munns et Tester, 2008).

1.6 Tolérance des céréales à la salinité

la tolérance des céréales à la salinité dépend de la variabilité génétique telle que certaines espèces qui résistent à ce type de stress abiotique que d'autres, d'après Munns et *al.*, (2006) . Notamment l'effet toxique des sels est moins prononcé chez le blé tendre que chez le blé dur. Ce caractère lui est conféré grâce à la présence du Kna1, un gène responsable à l'exclusion du sodium. En outre l'orge, arrive à croitre normalement dans des conditions considérées comme limitantes. En effet, en plus de l'exclusion de sodium, la plante d'orge se sert d'un autre mécanisme de tolérance à la salinité qui se manifeste par l'emprisonnement des sels dans un compartiment bien spécifique dans la feuille. Ceci non seulement lui épargne leurs effets toxiques mais aussi contrebalance la pression osmotique du sol (Munns, 2008).

1.7 Réponse et la stratégie adaptative de la plante aux stress salin

Les plantes peuvent répondre aux stress de diverses façon ; elles accomplissant leur croissance durant les périodes de moindre stress ou bien ne peuvent pas le supporter auquel cas elles peuvent subir des lésions. Ou bien, subies des modifications spécifiques de leur métabolisme leur permettant d'éviter ou de tolérer les effets de stress (Enita, 2000). Les plantes réagissent à ces variations de la salinité dans le biotope pour déclencher des mécanismes de résistance. Parmi ces mécanismes, l'ajustement osmotique joue un rôle primordial dans la résistance ou la tolérance de la plante à un stress (Belfakih et al., 2013).Celui ci est réalisé grâce à une accumulation de composés osmorégulateurs conduisant à une réduction du potentiel osmotique permettant ainsi le maintien du potentiel de turgescence (EL Midaoui et al., 2007), principalement des composés aminés et des sucres (Lzvigneron et al., 1995).

- ✓ **Exclusion**

La plante empêche le sel de remonter jusqu'aux feuilles , une première barrière existe au niveau de l'endoderme, couche interne de cellules de la racine .Cependant, cette barrière peut être interrompue, en particulier de l'émergence des ramifications de la racine. D'autres mécanismes limitent le passage de sel des racines vers les feuilles mais les gènes qui les gouvernent sont encore largement inconnus (EL Madidi, 2003).

- ✓ **Ajustement osmotique**

L'ajustement osmotique apparaît aujourd'hui comme un mécanisme majeur d'adaptation, il peut intervenir à tous les stades de développement et son caractère inductible suggère qu'il n'a pas (ou peu) d'incidence sur le rendement potentiel. L'ajustement osmotique joue un rôle primordial dans la résistance ou la tolérance de la plante à un stress (Kara et al, 2011).La plante devra synthétiser des solutés organiques pour ajuster son potentiel hydrique (Belfakih et al., 2013).

- ✓ **Inclusion**

La plante capte le sel, qui parvient aux feuilles, au même titre que l'eau, par le mouvement ascendant de la sève dans les vaisseaux. A l'intérieur des cellules, le sel est alors stocké dans les vacuoles grâce à des systèmes de "pompes" moléculaires. Les vacuoles sont des compartiments fermés au sein de la cellule. Le sel est ainsi isolé des constituants cellulaires vitaux (EL Madidi, 2003**).**

- ✓ **Accumulation de la proline**

La proline, observée chez de nombreuses monocotylédones ou dicotylédones, s'accumule aussi bien chez les glycophytes que chez les halophytes sur des cellules en suspension, ou des plantes entières pour restaurer l'équilibre osmotique entre cytoplasme et vacuole. La synthèse de proline est une mesure adaptative prise par les plantes et sa teneur est corrélée à la tolérance au NaCl (Denden et al., 2005).

- ✓ **Sucres solubles**

Les sucres solubles sont des voies des métabolismes végétaux présents aussi à la surface des plantes (Arnault et al., 2011). Ils sont stimulés par un stress salin (Levigneron et al., 1995), produits par blocage de glycolse ou le saccharose (provenant de l'hdrolyse de l'amidon). Ces sucres sont abondants dans le cas de concentration fortement salins et déshydratants (Hubac ; 1972, Binet ; 1980, in Bouhaddi ,2009). Les sucres pourraient contribuer à plus de 50% à l'ajustement osmotique des glycophytes soumises aux conditions de salinité (Farissi et al., 2014).

1.8 Atténuation du stress salin dans les plantes par les PGPR

Différente études ont suggéré que les rhizobactéries peuvent également développer un certain degré de tolérance chez les plantes donnant ainsi une résistance à ces derniéres. La tolérance peut étre définie comme la propriété intrinséque du microbe combattre des conditions stressantes, alors que la résistance est la capacité du microorganisme à résister à des condtions stressantes par certains mécanismes. Des données expérimentale indiquent que les microorganismes avec des capacités de tolérance/résistance peuvent aider les plantes à s'adapter avec succés à différentes situations stressantes (khan et al ., 2010 ; Milosevic et al ., 2012).

- ✓ **Synthése des auxines et de composés similaires**

Les auxines microbiennes peuvent affecter celles de la plante gouvernant un processus de développement tels que le développement des racines. ce développement racinaire permet en outre l'absroption des nutriments par les palntes, améliorant ainsi leur santé en présence de composés inhibiteurs dans des conditions de stress (Egamberdieva et Kucharova, 2009).
La production d'acide indole acétique est un trait relativement commun de PGPR, et de telles bactéries sont censées d'atténuer le stress salin dans les plantes. Dans la méme optique, Sadeghi et al ., (2012) ont démontré qu'un isolat de *streptomyces* a augmenté la croissance de la plante du blé en produisant de l'acide indole acétique en présence de sel .

- ✓ **Sécrétion des Exopolysaccharides (EPS)**

Les microorganismes appartenant à différents groupes fonctionnels, par exemple les rhizobactéries, sécrétent des exopolysaccharides (EPS) , qui fournissent une résistance aux cellules contre différents facteurs de srtess et protégent ainsi le microogranisme de stress . Les EPS améliorent également la structure du sol en formant des macroagrégats avec le sol, ce qui augmente encore la capacité de rétention d'eau du sol (Alami et al ., 2000). Les macroagrégats maintiennet l'équilibre dans les conditions aérobies et anaérobies dans le sol déterminent également l'absorption progressive des nutriments du sol. En cas de stress salin , ces agrégats aident à lier des cations (Na^+) en les rendant inaccessible aux plantes (Ashraf et al., 2004).
Les rhizobactéries ont la capacité de former des biofilms en sécrétant des polysaccharides et des protéines, la matrice ainsi formée limite la diffusion de composés tels que les hormones de coroissance végétale et les nutriments du voisinage de la plante , favorisant ainsi la croissance des plantes en atténuant les condition de stress (Timmusk et al ., 2013).

- ✓ **L'accumulation des osmolytes**

L'une des réponses au stress les plus courantes dans les plantes est la surproduction de différents types de solutés organiques compatibles tels que la proline, la glycine bétaine et le glutamate (Serraj et Sinclair, 2002). L'accumulation de la proline est un indice physiologique sensible de la réponse des plantes aux sel et aux autres stress pour maintenir un potentiel hydrique plus élevé pendant le stress (Peng et al., 2008).
Il a été démontré que les PGPR améliorent la tolérance au stress des plantes en contribuant à l'accumulation d'osmolyte dans les plantes (Zarea et al ., 2012) ont également signalé une augmentation de l'accumulation de proline dans le blé lors de la colonisation des racines avec les PGPR . La proline aide également la cellules végétale en stabilisant les structures subcellulaire telles que les membranes et les protéines , en éliminant les radicaux libres et en

temponnant le pontentiel oxydatif cellulaire sous stress salin pour atténuer ce stress (Ashraf et Foolad , 2007) .

2. Déficit hydrique

2.1. Définition

Le déficit hydrique est l'une des contraintes les plus courantes de l'environnement qui influe sur la croissance et le développement des plantes (Sadras and Milroy ,1996 ; Aslam et al., 2006). Il est définit comme une baisse de la disponibilité de l'eau. En effet, il est le résultat d'une combinaison complexe entre les facteurs du sol, de la plante et de l'atmosphère contrôlant le taux d'absorption de l'eau et les pertes d'eau par transpiration (Koslowski, 1968).

La contrainte hydrique est le facteur ou l'ensemble des facteurs qui provoque le stress chez les plantes (Lamaze et al., 1994).Un stress hydrique peut se produire aussi bien sous l'effet d'un excès que d'un manque d'eau. Le stress provoqué par un déficit hydrique est bien plus fréquent, de sorte que l'expression du stress de déficit hydrique est abrégée en stress hydrique.

2.2. Les effets du déficit hydrique

L'installation d'un déficit hydrique se manifeste par la combinaison, d'une part de la restriction de la disponibilité en eau du sol et, d'autre part, de l'augmentation de la demande évaporatrice (Kiani et *al.*, 2007). L'effet du manque d'eau dépend de son degré, sa durée, le stade du développement de la plante, le génotype et son interaction avec l'environnement (Aslam et al., 2006). On peut résumer l'effet du déficit hydrique sur la plante (Figure 4) en trois stades.

Effets précoces : La fermeture des stomates est l'une des réponses précoces au déficit hydrique, elle se fait en quelque minutes (Assmann et al., 2000). Elle a pour but la protection de la plante contre la déshydratation. Aussi, une diminution de la vitesse d'élongation cellulaire, la balance hormonale est fréquemment altérée (Lamaze et al., 1994).

Effets à moyen terme : Plusieurs solutés s'accumulent dans la cellule pour établir l'ajustement osmotique. Les solutés accumulés sont très variés et appartiennent à diverses familles biochimiques : des acides aminées, des amides, des polyamines, des acides organiques, des sucres, et des sels minéraux (Lamaze et al., 1994).

Effets à long terme : Des modifications morphologiques, anatomiques et physiologiques s'installent (Lamaze et al., 1994). Elles comprennent principalement une baisse du volume des nouvelles cellules, une réduction de la surface des feuilles et une augmentation de leur épaisseur, un vieillissement prématuré des feuilles matures et aussi une élévation du rapport racine/ feuille en terme de biomasse.

2.3. Stratégies de résistance au déficit hydrique

La résistance à la sécheresse est un terme générique qui comprend plusieurs processus, on en distingue classiquement trois : l'échappement, l'évitement et la tolérance. Ces stratégies impliquent des facteurs morphologiques, physiologiques et biochimiques à différents niveaux. (May et *al.*, 1962).

2.3.1. L'échappement

L'échappement concerne les espèces capables d'accomplir leur cycle de vie avant que le déficit physiologique en eau n'intervienne. C'est le cas des plantes des régions arides effectuant leur cycle reproductif après une pluie et dont les graines supportent de longues périodes de sécheresse. Cette stratégie ne s'applique pas aux plantes longévives comme les arbres.

2.3.2. L'évitement

La première façon d'éviter la sécheresse est l'esquive. L'esquive permet à la plante de réduire ou d'annuler les effets de la contrainte hydrique par une bonne adaptation de son cycle de culture à la longueur de la saison des pluies. Le développement phénologique rapide avec une floraison précoce, permet à la plante d'éviter les périodes sèches. Cette stratégie appliquée aux espèces cultivées a amené à décaler la date de semis et/ou à sélectionner des variétés plus précoces permettant d'éviter les déficits hydriques de fin de cycle. La deuxième façon d'éviter la sécheresse est la capacité de la plante à maintenir un état hydrique satisfaisant. La stratégie de l'évitement est principalement liée, d'une part, à la réduction de la transpiration et d'autre part, à une optimisation de l'absorption d'eau par les racines. La diminution de la transpiration est principalement liée à la fermeture des stomates. Il s'ensuit une chute de l'assimilation de CO_2 donc une baisse de production de biomasse. Elle peut être due également à une diminution des surfaces évaporantes. Parmi les mécanismes permettant de réduire la transpiration, la réduction de la surface foliaire et la diminution de la conductance stomatique.

2.3.3. La tolérance

La tolérance est la stratégie qui permet à la plante d'assurer ses fonctions physiologiques malgré une dégradation de son état hydrique. Le maintien de la turgescence lors d'un déficit

hydrique permet de retarder la fermeture des stomates (Passioura, 1996), de maintenir le volume chloroplastique et de réduire le flétrissement foliaire (Blum et Ebercon, 1981, Medrano et *al.*, 2003). Cette aptitude confère à la plante une meilleure tolérance au déficit hydrique interne. Cette tolérance au déficit hydrique interne permet un fonctionnement prolongé de la photosynthèse. Les produits carbonés peuvent alors être utilisés autant pour l'ajustement osmotique que pour la croissance racinaire. Une autre conséquence du maintien du métabolisme carboné sera une diminution de la fréquence des épisodes de photoinhibition.

Au niveau cellulaire, l'ajustement osmotique joue un rôle déterminant dans le maintien de la turgescence aux faibles potentiels hydriques foliaires.

La tolérance à la sécheresse est le résultat de mécanismes physiologiques, biochimiques et moléculaires complexes. L'expression de différents gènes et l'accumulation de divers osmolytes (l'ajustement osmotique) couplé à un système antioxydant efficace sont souvent les principaux mécanismes de tolérance au déficit hydrique (Tardieu, 2005).

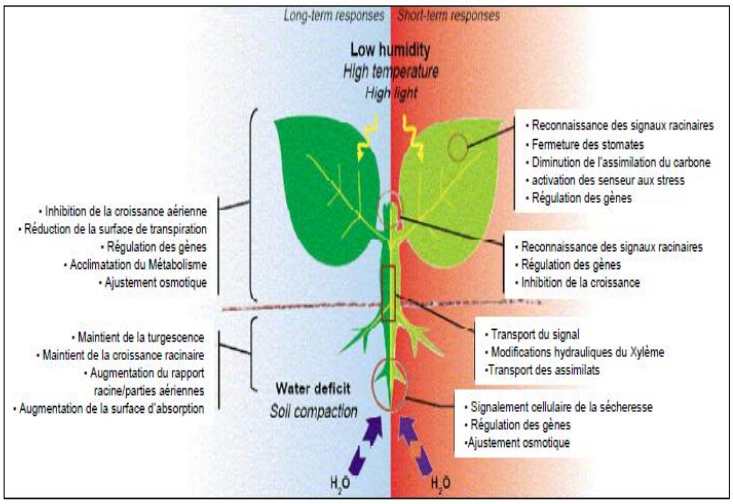


Figure 3 : Réponses de la plante à la sécheresse. (A gauche, réponse à long terme

; A droite, réponses à court terme)

III. Les bactéries rhizosphériques promotrices de croissance des plantes

1. Définition et structure de la rhizosphère

Le terme rhizosphère a été décrit pour la première fois en 1904 par un chercheur allemand Lorenz Hiltner, c'est un mot composé d'origine grec : " rhizo " ou" rhiza" signifiant" racine" et "sphère" qui veut dire « globe » ou « La zone du sol dans laquelle la microflore est influencée par les racines des plantes », donc rhizosphère peut être définit comme étant la fraction du sol qui entoure et englobe le système racinaire des plantes. (Prescott,2007)

La rhizosphère est définie aussi comme un environnement crée par les interactions entre lesexsudats racinaires et les microorganismes, elle est le lieu des échanges entre sol, racines, microorganismes et faune associés. Ces échanges, intenses, se traduisent par des flux bidirectionnels d'eau et de nutriments (Lynch, 1990).Elle constitue ainsi un habitat favorable pour la prolifération des microorganismes et exerce un impact potentiel sur la santé des plantes et la fertilité des sols (Hinsinger et *al*., 2006).

La rhizosphère est la zone du sol qui est adjacente aux racines, elle s'étend de quelques micromètres à plus de 2 mm en dehors de la surface racinaire. La surface des racines est définie comme le rhizoplan, l'endorhizosphère est définie comme le cortex des racines du fait qu'il est colonisé par les bactéries (Nehl et Knox, 2006).

La rhizosphère peut être aussi divisée en plusieurs zones distinctes. Ça inclus l'endorhizosphère (tissus racinaires), l'endoderme et les couches corticales, et inclue aussi la surface racinaire avec l'épiderme et les mucilages polysaccharidiques, et l'ectorhizosphère(Morgan et *al*., 2005) qui est correspond au volume de sol colonisé ou potentiellement colonisable par les microorganismes (bactéries ou champignons) et influencé par ceux-ci.

Sa définition peut s'étendre à la mycorhizosphèrecorrespondant au volume de sol qui environne une racine colonisée par un champignon mycorhizien (le champignon mycorhizien permet d'augmenter le volume de l'ectorhizosphère). (Balandreau et Knowles, 1978) .

2. Les bactéries rhizosphériques promotrices de croissance des plantes

2.1 Définition d'une communauté bactérienne

En Ecologie, une communauté est généralement définie comme un ensemble de populations, i.e. d'individus de différentes espèces qui coexistent en même temps et au même endroit (Begon *et al.* 1996). Mais cette définition est trop générale pour être appliquée directement aux communautés bactériennes. L'écologie microbienne a attribué le terme communauté pour désigner des assemblages d'espèces bactériennes qui sont en interaction dans un même écosystème, milieu, habitat et/ou qui partagent une même fonction.(Paul et clarck1996)

Une communauté bactérienne correspond donc à l'ensemble des populations bactériennes dans un habitat donné. Chaque espèce de la communauté prend part un système d'interactions complexes existant dans la rhizosphère entre le sol, les plantes et le biote du sol (Jossi, 2008).

3.Composition des communautés bactériennes rhizosphérique

Les bactéries rhizosphériques promotrices de la croissance des plantes, connue souvent dans le monde scientifique par l'appellation « PGPR », une abréviation anglaise de « Plant Growth Promoting Rhizobacteria », ce terme est attribué aux bactéries de la rhizosphère, qui interviennent dans la croissance et la santé des végétaux. Ces PGPR, regroupent à la fois, les bactéries qui stimulent la croissance des plantes par la fixation d'azote (*Rhizobium sp*), la production d'hormones (*Pseudomonas sp*), la solubilisation des phosphates (*Bacillus circulans*) (Reyes *et al.*,2004) et celles qui sont protectrices contre les agents phytopathogènes qui exercent des mécanismes d'antibiose (production de l'Oligomycine A par *Bacillus thuringiensis*)(Reyes *et al*.,2004), de compétition pour l'espace et les nutriments par la colonisation des racines (*Pseudomonas guilliermondii*) (Van Loon,2007) et de renforcement de la capacité défensive de l'hôte (*Pseudomonas putida*) (Van Loon, 2007) .

3.1. Les bactéries stimulatrices de croissance

Les bactéries rhizosphériques participent à la stimulation de croissance des plantes et par conséquent à l'amélioration de leur rendement par différents mécanismes : fixation d'azote, solubilisation des phosphates, production des sidérophores et les hormones de croissance.

- **Les bactéries fixatrices d'azote**

L'azote est l'élément nutritif le plus important pour les végétaux, c'est un facteur limitant majeur de la production agricole alors que l'atmosphère terrestre est constituée à 80٪ d'azote. Ce paradoxe est dû au fait que l'azote moléculaire (N_2) est une molécule très stable, que seuls les organismes appartenant au groupe des procaryotes sont capables de la réduire sous une forme combinée assimilable, par contre elle est inaccessible pour les organismes eucaryotes. (Pujic et Normand, 2009).

Le phénomène de la fixation biologique de l'azote atmosphérique qui s'effectue uniquement par les procaryotes se fait grâce à un complexe enzymatique appelé nitrogénase (Figure 4) qui assure la réduction de l'azote moléculaire (N_2) en ammoniaque (NH_3) une forme assimilable par les plantes. La fixation biologique de l'azote, joue un rôle majeur dans le cycle de l'azote, surtout la présence d'une très grande diversité dans leur mode de vie et leur association avec les végétaux (Weyers *et al*., 2010).

Les bactéries capables de fixer biologiquement l'azote sont appelées "diazotrophes" ou "systèmes diazotrophiques ".Ces systèmes comportent diverses espèces bactériennes, aérobies (*Azotobacter, Beijerinckia*,…..), anaérobies facultatifs (*Pseudomonas, Rhizobium*,……), hétérotrophes (*Klebseilla, Enterobacter* ,…..), phototrophes (*Azospirillum, Nostoc*,……). Les systèmes fixateurs les plus efficaces sont des symbioses qui réalisent un couplage entre la fixation d'azote et la photosynthèse (*Rhizobium* et *Frankia).*

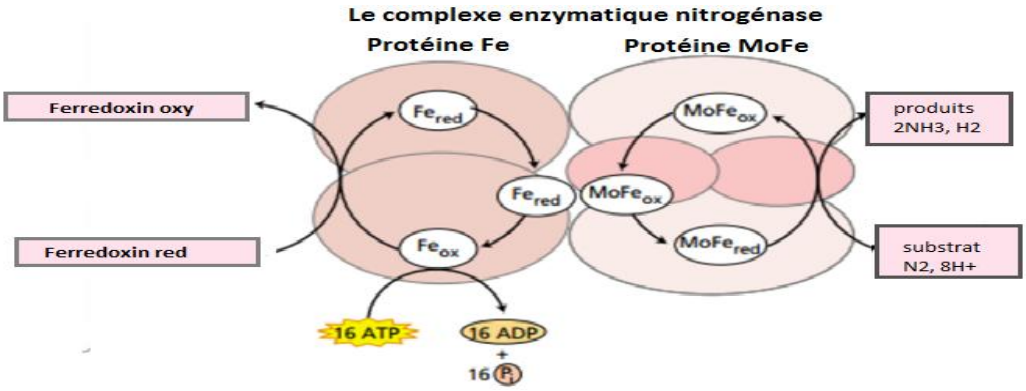


Figure 4: Fonctionnement du complexe enzymatique « la nitrogénase ».

- **Les bactéries solubilisatrices des phosphates**

Le phosphore (P) joue un rôle essentiel dans le transfert de l'énergie nécessaire à la croissance et à l'amélioration de la productivité des plantes. C'est un élément indispensable et irremplaçable pour les besoins vitaux des plantes. Sa concentration dans les sols, varie de 200 à 5000 ppm soit 0,02 à 0,5% (Lindsay, 1979). L'enrichissement du sol en P, suite à des applications de fertilisants, dépend des caractéristiques physicochimiques de ce sol, dans les sols acides, les oxydes libres et les hydroxydes d'aluminium et de fer fixent le phosphate, tandis que dans les sols alcalins, il est fixé par le calcium, ce qui rend le fertilisant peu efficace. (Lindsay, 1979).

Dans les sols agricoles, la solubilisation des phosphates inorganiques est étroitement liée à l'activité des micro-organismes du sol. Plusieurs rhizobactéries promotrices de la croissance telles que : *Bacillus megaterium, B. circulans, B. polymyxa, B. subtilis* et *Pseudomonas striata* ont été décrites comme étant des bactéries solubilisatrices du phosphate (PSB). (Igual *et al*., 2001). Les effets bénéfiques de l'inoculation des cultures avec des microorganismes solubilisant le phosphate, ont été décrits par plusieurs auteurs (Rodríguez et Fraga, 1999; Sarawgi *et al*., 1999).

Les rhizobia sont peut être le groupe le plus prometteur des PSB, du fait de leur capacité à fixer l'azote en plus. Plusieurs publications ont rapporté que les souches de *Rhizobium et*

Bradyrhizobium solubilisant le phosphate, améliorent considérablement la croissance et la teneur en phosphore des plantes aussi bien chez les légumineuses que chez les non légumineuses (Chabot *et al*., 1996; Peix *et al*., 2001). Toutefois, l'apport bénéfique des espèces de *Bacillus, Escherichia, Arthrobacter* et *Pseudomonas*, aux cultures, est estimé de 30 à 35Kg P_2O_2/ha (Gaur *et al*., 2004). Ainsi, et comme approche alternative pour améliorer la nutrition phosphatée des plantes, Igual et al., (2001) suggèrent l'utilisation des bactéries solubilisatrices des phosphates en tant qu'inoculum microbien seul ou en co-inoculation avec d'autres micro-organismes sélectionnés pour d'autres fonctions bénéfiques (Fixation d'azote, sécrétion d'hormones…).

Les travaux de plusieurs chercheurs ont montré que, les microorganismes dissolvant le phosphore et améliorant la croissance des plantes constituent deux groupes, ceux qui vivent à l'état libre non loin des racines et souvent même sur la racine sans y être liés et ceux qui vivent en symbiose avec les plantes (Leggett *et al*., 2001). Les microorganismes symbiotiques ont été largement étudiés et utilisés pour augmenter la production de plusieurs cultures. (Frey-Klett *et al*., 1999).

- **Les bactéries productrices des hormones**

La promotion de la croissance des racines par les hormones est l'un des facteurs principaux qui ont été identifiés comme étant bénéfiques au rendement des plantes. La production bactérienne des hormones constituent l'essentiel des mécanismes de stimulation de la croissance des plantes grâce à la grande sensibilité des racines aux hormones .Il existe cinq catégories des régulateurs de la croissance végétale: les auxines, les gibbérellines, les cytokinines, l'éthylène et l'acide abscissique (Zahir *et al*., 2004) .

Ces régulateurs de croissance jouent un rôle très important dans l'élongation des racines et dans la prolifération des poils absorbants (Spaepen *et al*.,2007). Ils sont produits par un grand nombre de bactéries (Figure 5) tels que : *Azospirillum brasilense, Pseudomonas spp, Xantomonas spp, , Enterobacter cloacae , Aeromona veronii, Alcaligenes piechaudii, Rhizobium leguminosarum, Bradyrhizobium spp, Agrobacterium spp et Comamonas acidovoran* (Weyens *et al*., 2010).

- **Synthèse de l'acide indole acétique**

L'acide indole acétique AIA est une auxine primaire active dans la majorité des plantes. Il fonctionne comme une molécule - signal importante dans la régulation du développement des plantes. L'AIA est aussi produit par les jeunes feuilles et les graines de végétaux à partir de réactions de transamination et de décarboxylation du L-tryptophane (Sachdev *et al*., 2009). En

général, le L-tryptophane constitue le précurseur principal pour l'AIA (Chung et Tzeng, 2004).

L'AIA intervient dans les premiers stades de l'embryogenèse. Il contrôle aussi bien l'organisation du méristème apical (phyllotaxie), la ramification des parties aériennes de la plante (dominance apicale), la formation de la racine principale, l'initiation des racines latérales et adventives (rhizogénèse).

Ces multiples effets sur les différents stades de la croissance de la plante résultent du contrôle que cette phytohormone exerce sur la division cellulaire, l'élongation cellulaire et certaines étapes de différenciation (Khalid *et al.*, 2004). Environ 80% des bactéries de la rhizosphère peuvent sécréter de l'AIA (Bhavdish *et al.)*,Parmi ces bactéries on retrouve certaines *pseudomonas* exemple :*Pseudomonas syringae* et aussi *Agrobacterium tuméfaciens.*

- **Production d'acide cyanidrique (HCN)**

L'acide cyanhydrique est un métabolite secondaire dont la glycine est le précurseur. Bien que le cyanure soit un inhibiteur métabolique général, il est synthétisé, excrété et métabolisé par certains organismes dont les bactéries comme un moyen d'éviter la prédation ou la compétition. Les plantes hôtes ne sont généralement pas affectées par le cyanure bactérien (Zeller *et al.*, 2007). Le composé agit directement sur les cellules de l'agent pathogène en bloquant la cytochrome oxidase dans la chaîne respiratoire. Cependant, en plus d'une activité protectrice, le HCN peut également être nocif pour la plante. La différence entre biocontrôle et effet nocif serait probablement due à des différences dans les niveaux d'expression des gènes de production du HCN.

Au niveau de l'adaptation à la rhizosphère, la production d'HCN peut être avantageuse pour acquérir des nutriments. Par exemple, le HCN cause une augmentation de l'exudation de nutriments par les tissus de la plante (Ellis et al. 2000). Il peut aussi contribuer à l'acquisition de certains ions métalliques en formant des complexes avec ceux-ci .De plus, en culture *in vitro*, la production de HCN peut même inhiber la croissance de plusieurs champignons phytopathogènes via la phase gazeuse (Blummer et al. 2000).

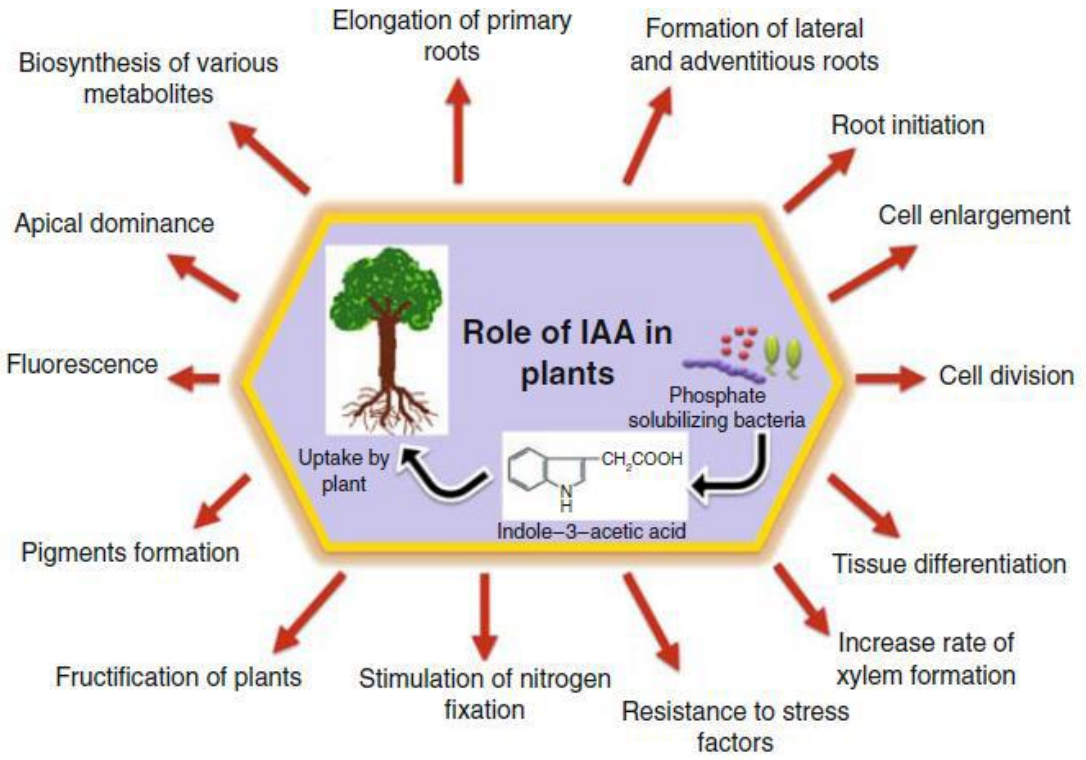


Figure 5: Rôles de l'AIA dans l'amélioration de la croissance des plantes (Khan *et al.*, 2009)

4. Bactéries protectrices contre les agents phytopathogènes

Les bactéries rhizosphériques peuvent jouer le rôle d'agents de biocontrôle et assurent par conséquence la croissance des plantes. Il s'agit de bactéries qui participent strictement à la lutte biologique (Fravel *et al*.,1999) par l'inhibition du pathogène (synthèse de molécules antibiotiques), stimulation des mécanismes de défense de la plante (synthèse de flavonoïdes, composés phénoliques, et autres phytoaléxines) et la production de chélateurs pour réduire la disponibilité des éléments minéraux (compétition et antagonisme).

La plupart des souches bactériennes exploitées comme agent de lutte biologique appartiennent aux genres *Bacillus* et *Pseudomonas* (Haas et Defago 2005). Beaucoup de recherches se sont concentrées sur ces deux derniers types de bactéries parce qu'ils sont des habitants communs de la rhizosphère et possèdent une grande activité dans le contrôle biologique de maladies liées au sol, ils ont la capacité de produire de nombreux antibiotiques, et ils sont faciles à cultiver in vitro ou à manipuler en laboratoire. De plus, les bacilles offrent un avantage par rapport aux autres bactéries en raison de leur capacité à former des endospores résistantes au changement des conditions du milieu (Haas et Defago 2005).

4.1. Les mécanismes de protection

Les bactéries protectrices contre les agents phytopathogènes exercèrent leur effet de lutte biologique par des interactions qui sont soit directes ou indirectes.

Interactions directes Bactéries/Pathogène

1. Compétition pour l´espace et les nutriments

Dans certains cas, une réduction de la maladie peut être associée à une colonisation importante des racines par les bactéries bénéfiques, ce qui réduit le nombre de sites habitables pour les micro-organismes pathogènes et par conséquence, leur croissance (Reyes et al.2004). En effet une rhizobactérie à croissance rapide pourrait éliminer les pathogènes fongiques par la compétition pour le carbone et les sources d'énergie. Parmi les bactéries qui peuvent exercer ce genre de mécanisme : *Pseudomonas putida, Bacillus pumilus* et *Serracia marcescens* (Tjamos *et al*., 2005) .

Le PGPR doit être présent sur les racines en nombre suffisant pour avoir un effet bénéfique sur les plantes et pour être capable d´´instaurer une compétition pour les nutriments dans la rhizosphère (Haas et Defago 2005). Outre la vitesse de croissance intrinsèque, les autres propriétés renforçant le potentiel colonisateur d´une souche sont la mobilité (présence d´un flagelle), le chimiotactisme et la faculté d´utilisation des composés excrétés par les racines en tant que sources de carbone et d´azote (Grover 2004) .

Un cas particulier de compétition pour les nutriments repose sur la compétition pour le fer. Les micro-organismes ont la capacité de synthétiser des sidérophores qui sont des molécules chélatrices du fer nécessaire à leur croissance. Ces composés ont une grande affinité pour le Fe^{3+}, en s´appropriant les ions ferriques présents dans la rhizosphère , ils les rendent ainsi non disponibles pour le champignon pathogène, ce qui provoque une diminution de sa croissance. Par exemple, certaines bactéries du genre Pseudomonas (*Pseudomonas aeruginosa)* ont un grand pouvoir de chélation du fer , elles peuvent reconnaître et utiliser les sidérophores produits par d´autres souches , alors que ces dernières ne sont pas capables d´utiliser le sidérophore qu´elles produisent. Cette particularité peut favoriser la souche dans le processus de la colonisation et la compétition pour le substrat mieux que d´autres habitants microbiens de la rhizosphère (Ongena *et al*.,2002). D´autre part , malgré que la production des sidérophores soit un mécanisme important pour l´activité des PGPR , elle est rarement essentielle dans le biocontrôle. Un grand nombre de facteurs environnementaux (pH, température el la source de carbone) influence la production des sidérophores. (Val de Benito *et al*.,2006)

2. Antibiose

L'antibiose est probablement le mécanisme le plus connu et peut -être le plus important, il est utilisé par les PGPR pour limiter l´invasion de pathogènes dans les tissus de la plante hôte . Il consiste en une inhibition directe de la croissance du pathogène via la production de métabolites aux propriétés antifongiques et/ou antibiotiques. Les souches de Pseudomonas

(*Pseudomonas guilliermondii)* produisent une variété de métabolites antifongiques puissants impliquées dans le biocontrôle, par exemple l'acide cyanhydrique (HCN), la viscosamine, la pyolutéorine, le 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG), la pyrrolnitrine, les phénazines, les butyrolactones, les tensines et les tropolones (Haas et Defago 2005). D'autre part l'oligomycine A, la kanosamine, la zwittermicine et la xanthobacine sont produites par *Bacillus thuringiensus* , *Streptomyces griseus* et *Stenotrophomonas maltophilia* (Nakayama *et al*., 1999).

Certaines souches de PGPR (*Pseudomonas fluorescens*) ont la capacité à dégrader les parois cellulaires fongiques à travers la production d'enzymes hydrolytiques tels que β-1,3-gluacnase, exo-etendo-polygalacturonases, pectinolyases, cellulases et chitinases (Whippes, 2001). Plusieurs facteurs abiotiques (l'oxygène, la température, des sources spécifiques de carbone et d'azote, et des micro-éléments), biotiques (la plante hôte, le pathogène, la microflore indigène, et la densité de cellules de la souche productrice) ont été identifiés pour influencer la production des antibiotiques par les agents bactériens de biocontrôle.

Interactions indirectes Bactéries/Plante

La reconnaissance par la plante de certaines bactéries de la rhizosphère peut conduire à une réaction d'immunisation lui permettant de mieux se défendre vis-à-vis d'une attaque par un organisme pathogène (Van Loon *et al*., 2007). Cette « immunisation » de la plante est appelée résistance systémique induite (ISR) (Van Loon *et al*., 2007; Jourdan *et al*., 2008). Ce phénomène d'induction de résistance systémique par les rhizobactéries est considéré comme une stratégie prometteuse dans la lutte biologique contre les maladies des cultures (Ramos *et al*., 2008). L'ISR peut être induite par des microorganismes variés incluent des bactéries à Gram positif comme *Bacillus spp*, ou des bactéries à Gram négatif appartiennent principalement au genre *Pseudomonas* (*P.fluorescens, P.putida, P.aeruginosa*), et aux entérobactéries comme *Serratia* (*S.marcesens, S.plymuthica*) ou *Pantoeaagglomerans sp.* (Jourdan *et al*., 2008).(figure 06).

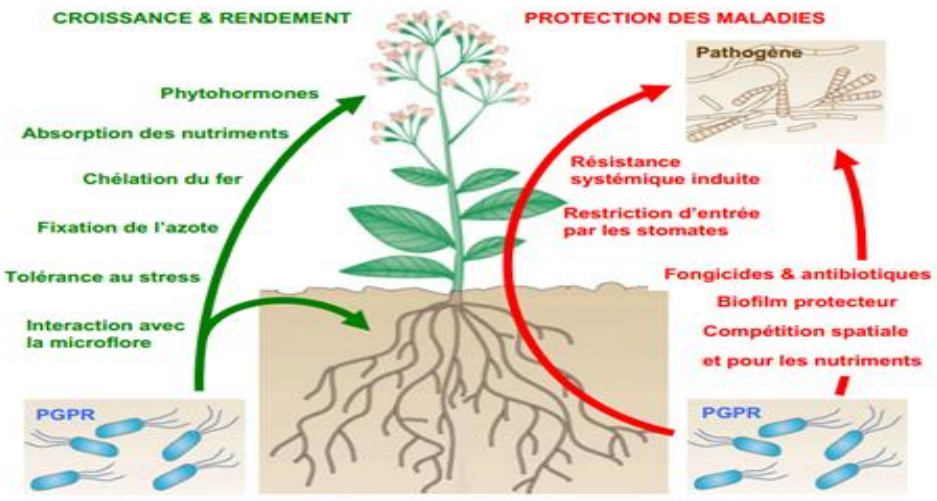


Figure 6 : Mécanismes d'action des PGPR.

Présentation site d'études

Le volet expérimental de notre étude a été réalisé au niveau de la station expérimentale de la faculté des Sciences Biologiques de l'Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumedienne, cette station se localise dans l'oasis d'El Meniaa, wilaya de Ghardaia (Figure 7).

El Meniaa anciennement appelée El Goléa est une grande oasis Algérienne d'une superficie d'environ 49 000km^2 (Chaiche, 2006) qui se trouve au centre du Sahara à environ 890km au sud d'Alger, à 280km au Sud-ouest de Ghardaïa, à 410km au Sud-ouest d'Ouargla, 480km au Nord d'In Salah et 380km à l'Est-nord de Timimoune. Ses coordonnées géographiques se présentent comme suit:

- Altitude : 397m. - Longitude : 02° 87' Est. - Latitude : 30° 57' Nord.

L'oasis est dotée d'un climat chaud et désertique avec des étés longs et extrêmement chauds et des hivers courts et chauds. Il ya très peu de pluie toute l'année, et les étés sont particulièrement secs. (Dubief, 2001).

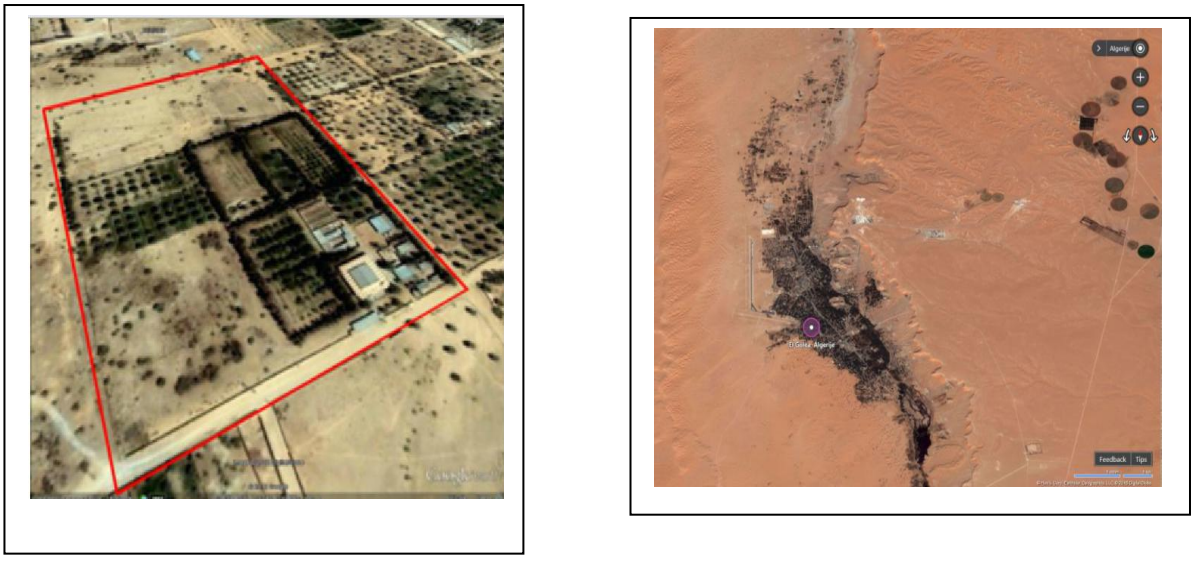


Figure 7 : Localisation de la région de El Golea (A) et la zone d'expérimentation (B) en vue par satellite.

I. Matériel

1. Matériel non biologique

Durant notre stage de fin d'étude nous avons utilisés des appareils (Annexe 1), solutions (Annexe 2) et des milieux de culture (Annexe 3).

2. Matériel biologique

- **Sol rhizosphérique**

Le sol rhizosphérique que nous avons utilisé pour notre étude a été obtenu après une culture de trois mois (Janvier-Mars2017) de plantes d'orges au niveau de la station de recherche d'El Golea (W.Ghardaia). Le sol utilisé pour la culture est un sol qui n'a pas été cultivé pour plus de 10 ans, à le quel des fertilisants organique ont été ajouté, avant de l'utiliser, le sol a été utilisé pour un cycle de culture d'orge durant la période Novembre2016-Janvier2017(figure 08), le sol ainsi récupéré et mélangé a été placé dans des parcelles de 100* 50*50Cm de dimension (Figure 08-a), durant la période de culture les plantes ont été irrigué par la technique d'inondation en raison de 100% de la capacité de rétention du sol utilisé.

A la fin de l'expérience, les plantules d'orge ont été prélevée en raison de 4 répétitions et placées dans des sachets stériles (figure 08-b), et transportés au laboratoire dans les conditions de froids (+4°C).

Les racines des plantes ont été coupées et placées dans des tubes corning contenant 25 ml de PBS (Phosphate Buffer +Silwett) (Annexe2). Après homogeinisation à l'aide d'un vortex pendant 15 sec, les racines, ont été transferé dans un autre tubes corning contenant 25 ml de PBS. à ce stade (Figure 09)., 1 ml de la suspension est déposées dans des cryotubes contenant 1 ml de glycérol 80%, et conservé à une température de -20°C , c'est à partir de ce stock que nous avons réalisés nos isolements .

- **Matériel végétal**

Nous avons utilisé pour tester l'effet PGPR de nos isolats, des graines de la plante cultivé *Medicago sativa* L. (luzerne) variété locale d'origine saoudienne.



Barley
Cultivated 3
Months
before/2nd
year



(a)



(b)

Figure 8 : La mise en place de l'expérience de culture de l'orge dans la région de Ménéa avant (a)et après récolte (b).

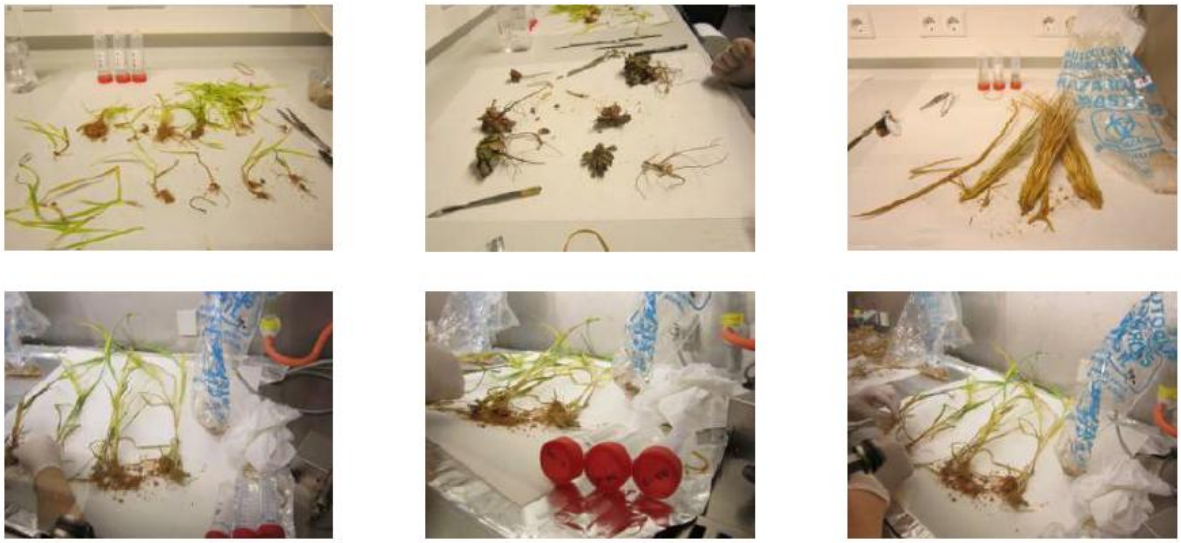


Figure09 : Les étapes de traitement des échantillons d'orge au niveau de laboratoire.

II. Méthodes

1. Analyse moléculaire de la diversité des communautés bactérienne rhizosphérique associées à l'orge

1.1. Extraction et isolement d'ADN

L'extraction d'ADN a été effectuée à partir de 0.25g du sol rhizosphérique collecté à l'aide de Kit d'extraction Power Soil ADN (Mobio, Carlsbad, CA).

1.2. Analyse quantitative de l'ADN

L'ADN obtenu est quantifié par un spectrophotomètre Nano-Drop (ND-1000 Technologies, Wilmington, DE). Il permet d'évaluer l'intégrité et la quantité d'acides nucleiques (en ug/ul) dans un échantillon.

2 µl est pipeté sur l'extrémité d'un câble à fibres optiques (la fibre de réception). Un deuxième câble à fibres optiques (la fibre de la source) est ensuite mis en contact avec l'échantillon liquide amenant le liquide à combler l'écart entre les extrémités des fibres optiques. Une lampe flash au xénon pulsé fournit la source lumineuse et un spectromètre utilisant une matrice CCD linéaire est utilisée pour analyser la lumière après avoir traversé l'échantillon. L'instrument est contrôlé par un logiciel basé sur PC, et les données sont enregistrées dans un fichier d'archive sur le PC.

1.3. Analyse qualitative de l'ADN

Un contrôle de la qualité de l'ADN est réalisé à l'aide d'électrophorèse sur gel d'Agarose 1%. C'est une méthode de séparation des macromolécules en fonction de leur taille et de leur charge électrique.

La qualité de l'ADN extrait est contrôlée en déposant 1ul avec 1ul de la solution tampon dans les puits d'un gel d'agarose1% .La migration se fait à 100 V pendant 1heure. Le gel est ensuite photographié sous UV.

1.4. Séquençage à haut débit

Le séquençage a été réalisée par les nouvelles technologies de séquençage (NTS) dites « à haut débit » sur la plate forme Illuminta Miseq . Les primers utilisés et le protocole de la PCR a été décrit par Edwards et *al*. (2007). Les amplifications PCR ont été menées en utilisant l'ensemble d'amorces 520F (5'-AGCAGCCGCGGTAAT-3 ') / 799R2 (5'-CAGGGTATCTAATCCTGTT-3') qui amplifie la région V4 du gène de l'ARNr 16S. Des amplicons avec des séquences adaptatrices de cellules d'écoulement Illumina attachées ont été ajoutés dans la plate-forme Illumina MiSeq 2.0 à des concentrations équimolaires. Des banques d'échantillons ont été préparées selon le guide de préparation du kit de réactifs MiSeq (Illumina, San Diego, CA, USA), et le protocole de séquençage de Caporaso et *al*. (2010b)

1.5. Analyse bio-informatique et statistique

Les séquences obtenus ont été traité dans le laboratoire de la biologie moléculaire de Wageningen-Pays-Bas avec différents logiciels, il s'agit de MOTHUR v. 1.36.0 (Kozich et al., 2013) pour l'identification des OTU's (Unité Taxonomique Opérationnelle) et QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) 1.9.1 et GENEI pour la vérification.

Les lectures de séquences ont été analysées en utilisant Mothur v. 1.36.0 (Kozich et al., 2013) et la procédure opératoire standard de MiSeq développée par le même laboratoire. Ce processus d'analyse implique la formation de contigs, l'élimination des séquences d'erreur et l'élimination des chimères. Les lectures de haute qualité ont été sous-échantillonnées à la plus petite taille de l'échantillon et classées avec un classificateur implémenté dans MOTHUR (classify.seqs) en utilisant la taxonomie SILVA fournie par les auteurs. Les séquences des chloroplastes et des organismes eucaryotes ont également été retirées avant la classification taxonomique. Toutes les unités taxonomiques opérationnelles (OTU) ont été regroupées avec un seuil de 0,03 (similarité de 97%). L'analyse des coordonnées principales (PCoA) ont été effectuées à l'aide de R v.2.15.2 (R Foundation for Statistical Computing 2).

2. Etude de la microflore bactérienne cultivable rhizosphérique d'orge

2.1. Dénombrement de la microflore bactérienne totale

A partir des stocks glycérols, nous avons préparé uns série de suspension dilutions. Nous nous sommes arrêtés à la dilution 10^{-2}. Nous avons étalé 50µl de cette dilution des sols rhizosphériques de l'orge sur boites de Pétri contenant du TSA 1/10. Le dénombrement de la microflore bactérienne totale a été réalisé 24-48H d'incubation à 25°C, en multipliant le nombre des colonies comptées (x) par le facteur de dilution (1/d) et par l'inverse du volume ensemencé (V), selon la loi de Kass :

$$\mathbf{N= x* 1/v*1/d}$$

Le nombre total des bactéries (N) dans l'échantillon de départ est exprimé par UFC/mL.

2.2. Isolement et purification de la microflore bactérienne

Les colonies obtenues repiquées jusqu'à l'obtention des cultures pures. Après purification un code a été attribué pour chaque colonie.

2.3. Recherche de l'activité PGPR chez les souches isolées

Dans le but de déterminer la capacité de production des substances favorisant la croissance des plantes par les souches isolées, plusieurs tests ont été réalisés:

2.3.1. Fixation d'azote moléculaire

Cette activité a été testée sur milieu Jensen. Les souches ont été ensemencés par stries sur la surface gélosée ensuite les boites sont incubées pendant 24-48H à 25°C, ce milieu étant exempte d'azote la croissance des colonies exprime que ces dernières fixent l'azote moléculaire N_2 (Vincent, 1970).

2.3.2. Solubilisation des phosphates

Les souches bactériennes ont été testées par le test décrit par Nautyal (1999), en utilisant le milieu gélosé National Botanical Research Institute Phosphate (NBRIP). contenant le phosohate tricalcique ($Ca_3(P0_4)_2$) comme seule source de phosphate ensemencé en spot à la surface des boites de Petri. Après 14 jours d'incubation à 25°C, l'apparition d'un halo transparent autour des isolats traduit un résultat positif.

2.3.3. Production d'acide cyanhydrique

La capacité des isolats à produire l'acide cyanhydrique a été vérifiée selon la méthode de Bakker et Schippers (1987) dont le principe est : en présence d'une base (NaCo3) l'acide picrique mis en présence d'HCN donne une coloration rouge sang intense due à la formation de l'acide isopurpurique.

Chaque isolat a été inoculé par stries sur une boîte de Pétri contenant le milieu composé de TSA 1/10 additionné de 4,4 g de glycine par litre d'eau distillée. Un papier filtre d'environ 6 Cm de diamètre est déposé dans le couvercle de chaque boite Pétri en position inverse. Ce papier est par la suite imprégné d'une solution de couleur orangée contenant 0,5% d'acide picrique et 20% de carbonate de sodium. Les boites de Pétri sont scellées avec du papier parafilm et incubées à 25°C. Les boites sont vérifiées quotidiennement afin d'identifier les boites Pétris dont le papier filtre a changé de couleur du jaune au rouge orangé indiquant la synthèse de l'HCN.

2.3.4.Production d'acide indole acétique

Sur des boîtes de Pétri contenant le milieu solide de Luria-Bertani (LB) et du LB enrichi avec du tryptophane (LBT), les souches ont été inoculés par stries afin d'identifier leur capacité à produire l'AIA. Les Pétris inoculés, ont été incubés à 25°C pendant 7 jours. Par la suite on prépare une suspension bactérienne dans l'eau physiologique qui serra centrifugée à 5000rpm pendant 10mn. 2 ml du surnageant est additionné par 2 ml de solution de Salkowski et quelques gouttes d'acide orthophosphorique (10mM). Le mélange est incubé à température

ambiante pendant 2 h. Le développement de la couleur rose indiquait la production de l'AIA (Bric et *al.*, 1991).

2.3.5.Production de sidérophores

La synthèse des sidérophores est testée sur milieu au Chrome Azurol Sulfate ou CAS gélosé proposé par Shwyn et Neilands(1987), les isolats sont ensemencés en spots, les boites de Pétri sont incubées à 25°C pendant 7 jours.

Un résultat positif se traduit par un changement de couleur du bleu à l'orange autour de la colonie productrice de sidérophores. Le changement de couleur est dû au transfert des ions ferriques du CAS vers les sidérophores.

2.4.Caractérisation

Sur la base de la capacité des isolats à produire des substances favorisant la croissance des plantes, nous avons sélectionnées seulement les souches qui ont donné un résultat positif à l'ensemble des 5 critères fixés à savoir : La fixation d'azote, la solubilisation d phosphate, la production d'auxine, la synthèse de HCN et la production des sidérophores), seule ces isolats ont été caractérisées sur le plan morphologique, physiologique et biochimiques.

2.4.1. Etude microscopique

L'observation microscopique consiste à observer les cellules bactériennes après une coloration de Gram.

Examen après coloration de Gram

La coloration de Gram est une double coloration qui nous permet de connaitre la forme, l'arrangement, la pureté ainsi que la nature biochimique de la paroi des bactéries purifiées

2.4.2. Caractérisation physiologique

Pour une caractérisation physiologique de nos isolats, nous avons retenus un ensemble de critères, il s'agit de : La température, le pH, l'acidification/alcanisation du milieu, le stresse salin (NaCl) et le stresse hydrique (PEG 6000). L'ensemble des tests a été réalisé sur des boites de 96 puits sur le milieu TSB.

Pour la température nous avons retenues 4 température d'incubation (4°C, 25°C et 40°C et 60°C).

La variation du pH a été réalisé à l'aide de HCl 1% et du KOH1%, nous avons fixé trois pH :4 ,7 et 10.

L’effet de la salinité a été réalisé par l’ajout de NaCl pour avoir trois concentrations, il s’agit de 250mM, 500mM , 1M.

Les concentrations de PEG ajoutés dans le TSA, afin de créer un déficit hydrique étaient de 10 g/l, 20g/l et 30g/l.

En ce qui concerne les modalités de préparation des milieux, la modification apportée consiste en une stérilisation par microfiltration à 0,25µm, en condition stérile, de la majorité des substances, à l’exception du PEG 6000, ou l’autoclavage est obligatoire, à cause de la consistance visqueuse de ce produit.

La croissance des souches qui se traduit presque toujours par une acidification ou une alcalinisation du milieu est signalée par un virage du bleu de bromothymol vers le jaune ou vers le bleu. Lorsque ce virage n’est pas obtenu, les puits sont observés minutieusement à l’œil nu, en vue de rechercher un trouble bactérien révélateur de croissance.

2.4.3.Caractérisation biochimique

- **Activité gélatinase**

La capacité des isolats à dégrader la gélatine est testée sur un milieu à base de gélatine solidifiée dans des tubes en culot. Les souches étudiées sont ensemencées par piqure centrale puis incubés à 25^{o}C pendant15 jours. Par la suite ces tubes sont placés au froid (+4^{o}C) pendant environ une heure. Le résultat est dit positif si le tube reste liquide même après passage au froid. (Delarras, 2014).

- **Activité amylase**

L’activité amylase des isolats a été détectée sur milieu solide TSA 1/10 additionnée d'amidon à 1% .L'ensemencement se fait par spot sur le milieu gélosé puis incubé à 25^{o}C pendant 5 jours.la révélation se fait par l'inondation des boites par une solution iodée (Lugol). L’hydrolyse de l’amidon se traduit par un halo clair autour de la colonie, contrairement aux zones contenant de l’amidon qui se colorent en bleu (Delarras ,2014).Le diamètre du halo d’hydrolyse est obtenu en soustrayant le diamètre de la colonie de celui diamètre total pour chaque isolat.

- **Activité catalase**

Ce test a pour but de mettre en évidence l'acquisition des bactéries de l'enzyme catalase qui dégrade H_2O_2 en H_2O et O_2.

L'examen s'effectue sur une lame propre et sèche, on dépose une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes, puis à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée, ajouter l'inoculum bactérien et observer immédiatement. Un dégagement de bulles d'air signifie la présence de l'enzyme.

- **Résistance aux métaux lourds et antibiotiques**

La résistance aux antibiotiques et métaux lourds a été réalisé avec trois antibiotique (Ampicilline , Amoxicilline , Lexine) et trois métaux lourd ($CaCo_3$, Cu, Zn,) en raison de deux concentrations 100 mg/ml et 200 mg/ml. Les solutions préparé à base des antibiotiques et/ou métaux lours ont été préparé avec de l'eau distillée et stérilisé par filtration (25um) puis additionnés au milieu TSB préalablement préparé et autoclavé, la croissance des souches a été noté par un virage de couleur de bleu de bromothymol.

3. Effet de l'inoculation des bactéries P.G.P.R. sur la morphologie et le développement des plantes

3.1. Mise en place de l'expérimentation

Afin de pouvoir déterminer l'effet PGPR des bactéries que nous avons isolées, sur les plantules de la luzerne (*Medicago sativa L.),* nous avons suivre les étapes suivantes :

- **Stérilisation des graines**

Les graines sont stérilisées par trempages successifs dans de l'Alcool éthylique à 95 % pendant une minute, suivi d'un rinçage à l'eau distillée stérile, puis les graines ont été trempées dans l'hypochlorite de sodium à 30 % pendant trois minutes. A la fin, les graines ont été rincées quartes à cinq fois avec de l'eau distillée stérile puis déposées dans une boite de Pétri stérile. Une fois stérilisées, les graines sont déposées à l'aide d'une pince stérile dans des tubes Corning contenant 30 ml de milieu minéral gélosé.

- **Préparation d'inoculum**

Les inocula bactériens ont été produits par l'ensemencement des tubes Corning contenu 30 ml du milieu liquide TSB avec les souches sélectionnées puis déposées sur un agitateur rotatif à 100 rpm à 30 ^{o}C pendant 72 heures. Les cellules bactériennes ont été ensuite concentrées par

centrifugation à 6000 rpm pendant 5 minutes, le surnagent est éliminé et remplacé par 15 ml d'eau physiologique stérile, ce dernier est homogénéisé à l'aide d'un vortex.

- **Inoculation des graines**

Les graines sont inoculées par la suspension bactérienne préparée précédemment d'une façon à mettre 2 ml pour chaque graine. Chaque test a connu trois répétitions. Des graines non inoculée ont été utilisées comme témoin**.**

La totalité des tubes sont placés dans endroit obscur à température ambiante pendant 5 jours pour la germination, puis transféré à un endroit lumineux .L'expérience est maintenue pendant 1 mois.

- **Application de stress**

Deux stress abiotique ont été appliqué, un stress saline à l'aide de NaCl, trois niveaux ont été appliqué, il s'agit de 75mM, 150mM et 300mM, et un stress hydrique, avec le PEG 6000, 3 niveaux de stress ont été appliqué, il s'agit de 10 g/l, 20g/l et 30g/l.

3.2. Mesure de l'effet de l'inoculation sur la croissance des plantes

- **Paramètres biométriques**

Après 21 jours de croissance, les plantes sont récoltées. La taille et le poids frais sont les deux paramètres qui ont été pris en considération.

- **Dosage des pigments chlorophylliens**

Pour chaque plantes 20mg de matière végétale fraiche est broyé dans un mortier en présence de 2 ml d'acétone 80% à froid. Une centrifugation est réalisée pendant 2 mn à 2000rpm après récupération du surnageant le dosage est réalisé à l'aide d'un spectrophotomètre qu'on étalonne avec de l'acétone 80% à différentes longueurs d'ondes : 645 nm et 663 nm correspondant respectivement aux pics d'absorption des chlorophylle b, chlorophylle a.
Les teneurs sont déduites par les formules de Lichtenthaler et Wellburn (1987)

$$\textbf{Chl a (µg/ml)} = (12.7 * D.O_{663}) - (2.7 * D.O_{645}).$$

$$\textbf{Chl b (µg/ml)} = (22.9 * D.O_{645}) - (4.7 * D.O_{663}).$$

$$\textbf{Chl total (µg/ml)} = \textbf{Chl a+ Chl b} = 20.2 * D.O_{645} + 8.02 * D.O_{663}$$

- **Dosage des prolines**

La teneur en protéines est déterminé selon la méthode développée par Bradford et al (1976) qui implique l'adsorption du bleu de Coomassie Brilliant G-250 sur la protéine, cette complication entraîne un décalage du pic d'absorption du colorant de 465 à 595 nm qui passe du rouge au bleu dont l'intensité est proportionnelle à la concentration des protéines présente dans l'échantillon .

50 mg de matière végétale fraiche est broyé dans 2 ml de solution tampon de borate se sodium (0.1N;pH 8.8).Le broyat ainsi obtenue est centrifugé à 10°C pendant 15 mn à 12000 rpm ,à 100 µl du surnageant sont rajoutés 3 ml de réactif de Biorad, l'ensemble est homogénéisé puis incubés pendant quelques minutes .
L'absorbance est déterminé à une longueur d'onde de 595 nm en présence d'une gamme étalon du sérum albumine bovine (BSA) préparé à partir d'une solution mère de 1mg/ml (Figure 10).

Y=0.035x alors D.O=0.035C C= D.O/0.035

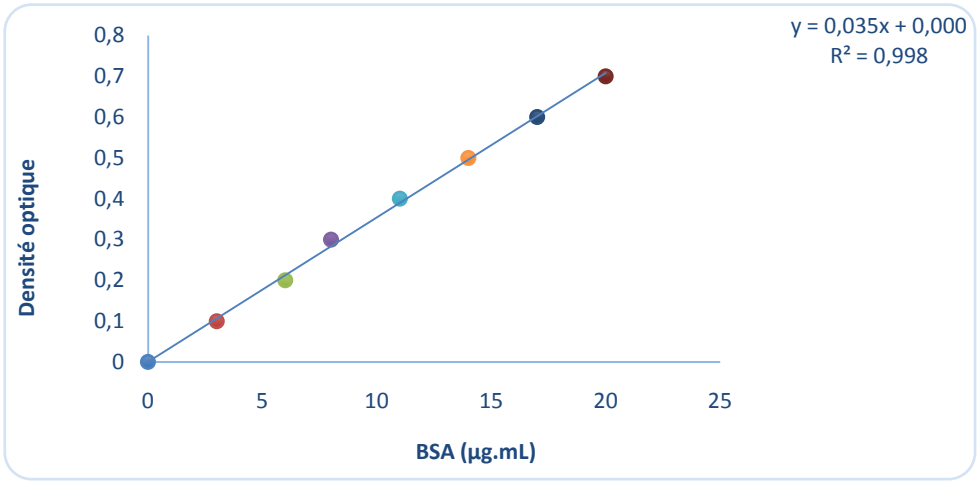


Figure 10 : Courbe d'étalonnage des prolines (BSA en µg/ml)

I .Analyse métagénomique de la microflore bactérienne rhizosphérique

Le désert représente 30% de la surface de la terre. Les conditions de vie dans ces environnements sont un réel défi pour les micro-organismes à cause de nombreux facteurs limitant (peu d'eau et/ou de carbone disponible, une variation importante de température et une forte exposition aux irradiations UV).

Les résultats de l'analyse métagénétique de la région V4 de l'ARN 16S sur la plate forme Miseq-Illumina ont révélé une grande diversité bactérienne représentée par 343169 reads (équivalent de séquences) obtenus par reconstruction phylogénétique et en utilisant les bases de données taxonomiques RDP (Ribosomal Database Project II), Greengenes et Silva. Les reads ont été raprti sur 5645 OTUs (Unité Taxonomique Opérationnelle) différentes c'est-à-dire de clusters distincts définis par le regroupement des séquences des reads au seuil de similitude de 97%. Le nombre de reads enregistrés peut être comparé à ceux obtenus pour d'autres sols rhizosphérique au sein de la même expérience ou avec ceux rapportés dans la littérature avec des conditions opératoires similaires (Suleiman et al., 2013 ; Carbonetto et al.,2007).

Les OTUs que nous avons sont répartis entre les deux domaines ; les Archaea et les Eubactéries. Cependant le nombre de reads indique que les bactéries sont largement prédominantes puisqu'elles représentent au moins 94.6% du nombre de reads obtenus. Ce résultat indique que les milieux analysés offrent des conditions pas trop sévères que profite aux Eubactéries.

Les résultats taxonomiques indiquent également que les Archaea sont représentés par 3 phylums (Euryarchaeota, Thaumarchaeota, Woesearchaeota) tandis que les Eubactéries par 38 phylums.

Les 3 phylums des Archaébactéries sont représentés par 11 genres avec une très large prédominance des Thaumarchaeota (0,71% sur les 0,74% de reads des Archaébactéries) et du genre Nitrosopumilus (0,66% sur les 0,71% de reads des Thaumarchaeota).

Les phylums des Eubactéries les plus abondants sont les Proteobacteria, Bacteroidetes, Acidobacteria, Actinobacteria, Planctomycetes, Verrucomicrobia, Chloroflexietles, et les Firmicutes. Ils représentent à eux seules 96,23% du total des reads, ces résultats sont proches à ce qui a été rapportés par Pointant et *al* (2008) concernant l'étude du microbiome du désert du Namib où, la majorité des séquences d'ADNr 16S affiche plus de 94% d'homologie avec les *Bacteroidetes, Planctomycètes, Chloroflexi, Firmicutes , et Betaproteobacteria*.

En 9ème position par ordre de nombre de reads, un phyllum qui est inconnu mais relativement bien représenté avec 0,98% du total des reads.(Figure 11).

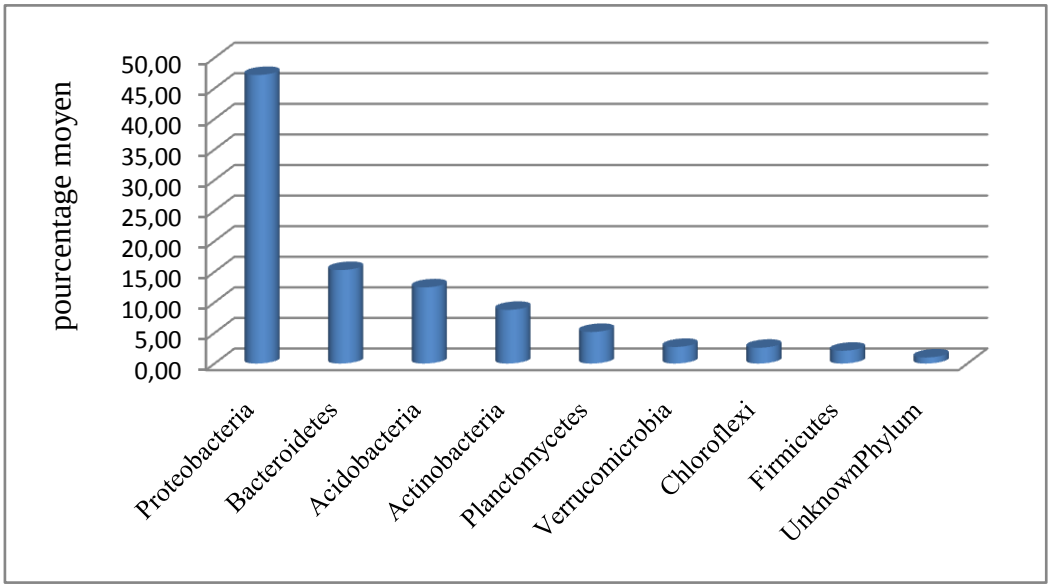


Figure 11: Classement des phylums abondants des Eubactéries dans les échantillons étudiés.

Nous avons remarqué une abondance des Proteobactéries avec 47,18% du total des reads. Ces bactéries Gram négatifs, sont distribuées à l'échelle mondiale et ont été considérés comme des membres importants de communautés bactériennes du sol du désert pauvre en éléments nutritifs (Lester et *al*., 2007).

Dans ce phylum Proteobacteria, les membres du *Gammaproteobacteria* (23,82%) représentent le groupe les plus abondants suivis par les membres du *Alphaproteobacteria* (19,24%) et *Betaproteobacteria* (5,53%).(Figure 12).

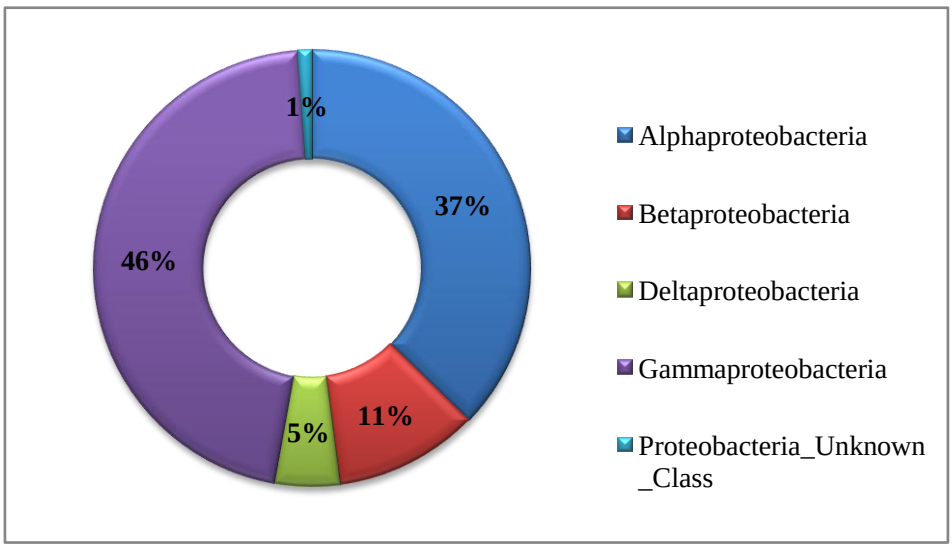


Figure12 : Pourcentage des classes des Protéobactéries.

Le phylum qui occupe la troisième place avec 9922,33 reads, est le phylum Acidobacteria qui inclut 5 genres avec une prédominance du genre *Blastocatella* représenté par 7404 reads.

Le premier genre de ce phylum a été découvert en 1991. Comme ils ont récemment été découverts, la grande majorité des espèces n'a pas été cultivé, l'écologie et le métabolisme de ces bactéries ne sont pas bien compris. Cependant, ces bactéries peuvent être un facteur important pour les écosystèmes, car ils sont particulièrement abondants dans les sols.

Tableau I : Nombre de reads qui représente les genres dominants dans le phylum Acidobacteria

genres du phylum Acidobacteria	**Le nombre de reads**
Blastocatella	**7404,00**
Bryobacter	1111,67
Solibacter	140,33
Koribacter [Candidatus]	14,67
Holophaga	1251,67
Total	**9922,33**

II .Analyse de la composition de la microflore bactérienne cultivable rhizosphérique de l'orge

Après une incubation de 48h à 28°C de nos boites, nous avons dénombrés 36500 UFC obtenu à partir du sol rhizosphérique de l'orge. Les bactéries constituent l'essentiel de la microflore du sol et sont extrêmement nombreuses, on estime par exemple que 1g de sol contient entre 10^6 à 10^9 Bactéries (Soltner, 2003 in Karabi ,2010).

Selon Dommergues et Mangenot (1970), la densité bactérienne dans les sols soumis à des conditions écologiques dures (régions arides et régions polaires), sont faibles mais elles sont rarement au-dessous de 10^4 - 10^5 germes /g de sol sec dans les horizons superficiels, cela est confirmé par nos résultats.

Dans la rhizosphère, les bactéries sont les organismes les plus nombreux (leur densité est de l'ordre de 10^9 par gramme de sol et les plus variés. Elles sont plus fortement stimulées par l'effet rhizosphèrique que les actinomycètes, les champignons, les algues et les protozoaires (Dommerrgues et Mangenot 1970).

Graysron et al. 1998 ont remarqués que la microflore rhizosphèrique diffère d'une espèce végétale à une autre et aussi à l'intérieur d'une même espèce. D'après les travaux de ce même auteur, la diversité des microorganismes rhizosphèrique de différentes espèces végétales peut être due à la variation des sources de carbone exsudé par ces plantes.

1. Caractérisation fonctionnelle des bactéries rhizosphérique

1.1. Fixation d'azote

L'azote est considéré comme un élément nutritif clé dans la production de cultures agricoles et l'un des principaux constituants des protéines , des acides nucléiques et des autres composants cellulaires essentiels (Martinez-Vivero et al ., 2010). La fixation d'azote moléculaire est considérée comme l'un des principaux mécanismes par lequel la plante bénéficie de l'association microbienne, et elle constitue une source majeure de l'azote pour les plantes dans le cadre d'une pratique agricole respectueuse de l'envrironnement (Cakmakci et al ., 2006).

La croissance des colonies sur le milieu Jensen, étant exempte d'azote, exprime leur capacité à fixer l'azote moléculaire (N2). Sur l'ensemble des 73 isolats bactériens, 73 ont été capable de fixer l'azote atmosphérique (Figure 13).

La forte capacité de fixation d'azote des bactéries rhizosphérique de l'orge a été signalé par Chaves et al (2002), ils ont montré que 98 % des Rhizobacéries d'orge sont capable d'assimilés l'azote. Aussi, dans les conditions de sécheresse dans la région d'Oum El Bouaghi (Algérie), Chenafi *et al.,(* 2006) notent que les bactéries isolées à partir des environnement arides ou salins sont capables de survivre et fixer l'azote à des concentration salines inhibitrices par rapport à

celles isolées d'habitas non salins (Hayat et al., 2013). On peut noter aussi, que les rhizobactéries d'autres céréales comme le blé, sont capables de fixé l'azote atmosphérique selon les travaux de Oulbachir (1997) réaliser dans la région de Tiaret.

En effet, la température optimale de la fixation d'azote d'une espèce bactérienne est généralement corrélée avec la température de l'habitat normal de cette espèce. Les températures critiques de la fixation d'azote sont de 30°C pour la trèfle et le pois (Michiels et al., 1994), de 30°C à 33°C pour le Haricot (Piha et Munns, 1987) et varient entre 35°C et 40°C pour les graines d'arachides et de soja (Michiels et al., 1994).

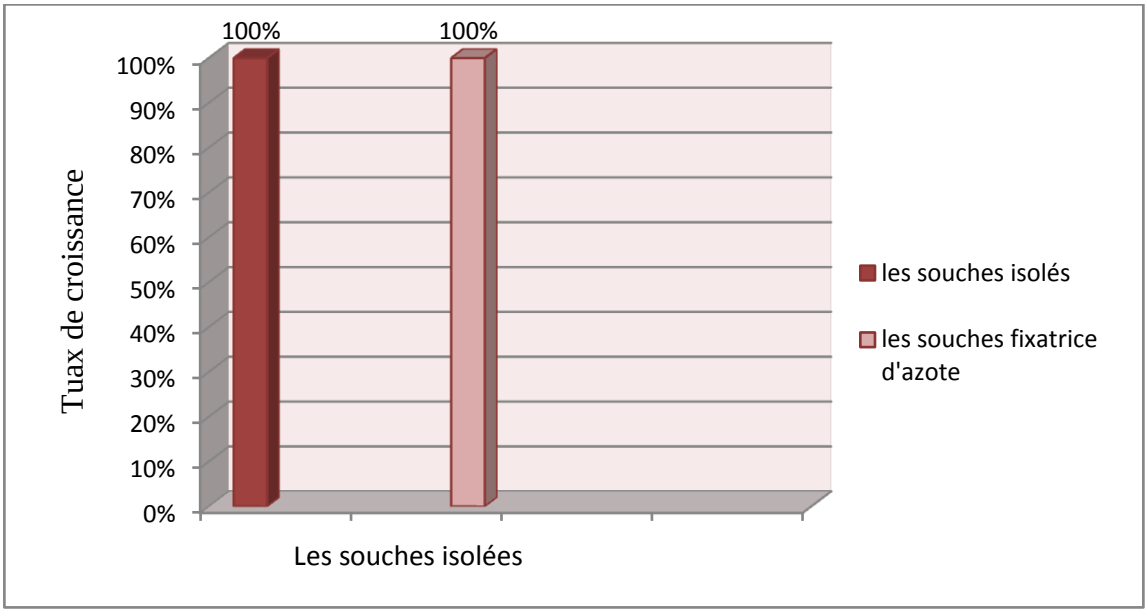


Figure 13 : Capacité de fixation d'azote par les isolats rhizosphérique isolée

1.2. Solubilisation des phosphates

Le phosphore, avec l'azote et le potassium, fait partie des trois éléments nutritifs majeurs pour la croissance des végétaux. Il est impliqué dans les premiers stades de développement de la plante, joue un rôle primordial dans la croissance racinaire, dans la rigidité des tissus, ou encore dans la formation des inflorescences et des fruits. Il est aussi essentiel dans la synthèse de la matière vivante végétale qui permet aux plantes de se nourrir.

Malgré sa teneur relativement importante dans le sol, tout le phosphore n'est pas présent sous une forme assimilable pour les plantes. En effet, les plantes sont uniquement capables d'assimiler le phosphore sous ses formes $H_2PO_4^-$ et HPO_4^{2-} (ions phosphates) (Nautiyal, 1999).

La solubilisation des phosphates est traduite par la formation d'un halo autour des colonies qui ont pu être développé sur le milieu NBRIP, la capacité à solubiliser le phosphate inorganique varie d'une souche à une autre, nous avons trouvé que sur l'ensemble des 73 isolats rhizosphérique testés, 73

isolats, soit un pourcentage de 100% des bactéries isolées, ont été capables de solubiliser le phosphate inorganique sur le milieu NBRIP (figure 14).

Le calcul du diamètre de l'halo de solubilisation nous a permis de réaliser une estimation quantitative de la capacité solubilisatrice de chaque isolat bactérien Goldstein (2000).

Les résultats obtenus au cours de ce test concordent avec plusieurs travaux qui ont démontré la capacité des bactéries rhizosphériques de solubiliser les phosphates (Rodriguez et Fraga, 1999; Verma et *al*., 2001).

Goldstein (2000) a démontré que la capacité de la solubilisation de phosphate et classé en 3 catégories , la première catégorie décrite comme faible (diamétre 0.5-2 mm) , la deuxiéme comme modérée (3-10mm) et la toisiéme comme forte (11-21mm), parmi nos isolats solubilisatrices de phosphates 8% ont une faible solubilisation, 78% se sont révélé moyennement solubilisatrices et 14% ayant une forte solubilisation de phosphate (Figure 15-A), (Figure 15-B).

Des résulats similaires ont été répportés par Goldstein (2000), en confirmant que les rhizobactéries de l'orge sont très efficaces dans la solubilisation des formes complexes de phosphate insolubles à des formes accessibles aux plantes. Cependant, quelques auteurs (EL-Azeem et al.,2007 et Baig et al., 2010) ont rapportés que les rhizobactéries de blé sont capable de solubilisées le phosphate avec des quantités différentes.

Quleques études ont également montré que les souches bactériennes isolées du sol alcalin peunvent solubiliser les phosphates à des concentrations élevées de sel et des pH et des températures élvées (Nautiyal,1999 ; Rodriguez et Fraga,1999).

Tableau II : Diamètre du halo de solubilisation du phosphate par les isolats rhizosphérique testés

Diamétre en (mm)	**Nombre de souches**	**Pourcentage %**
[1-5]	32	44
[6-10]	31	42
[11-16]	10	14

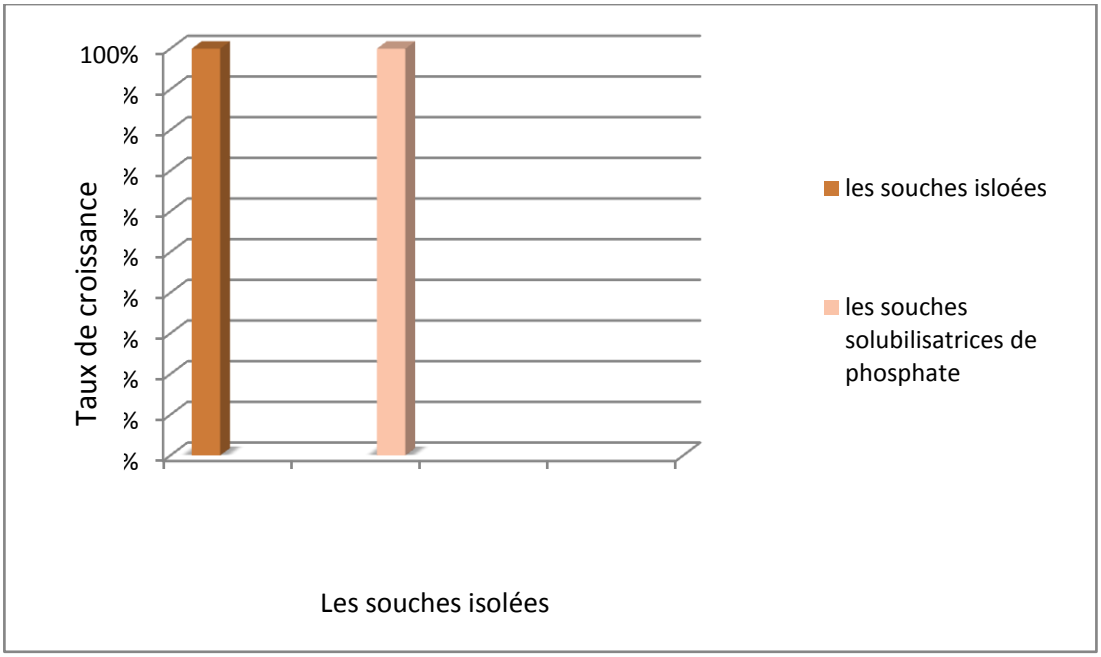


Figure 14: la Solubilisation du phosphate des souches isolées exprimée par l'apparition d'une zone claire autour des colonies sur un milieu solide NBRIP (National Bota-nique Research Institute phosphate).

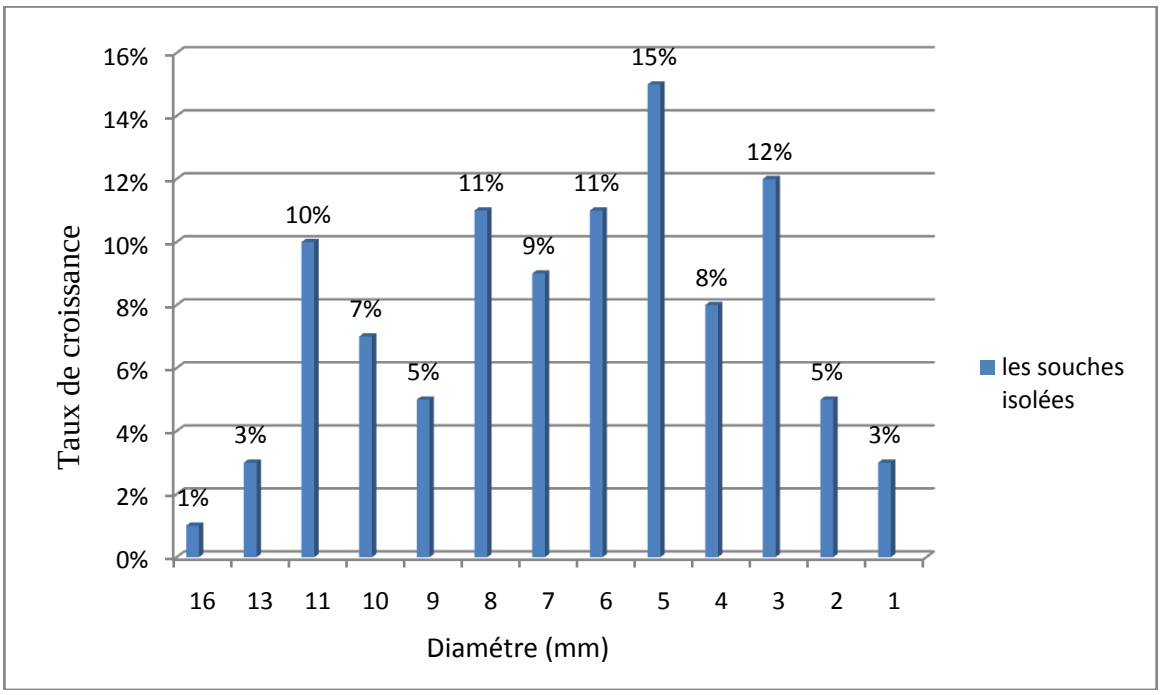


Figure 15 -A : diamètre du halo de solubilisation du phosphate par les souches rizoshpérique isolées

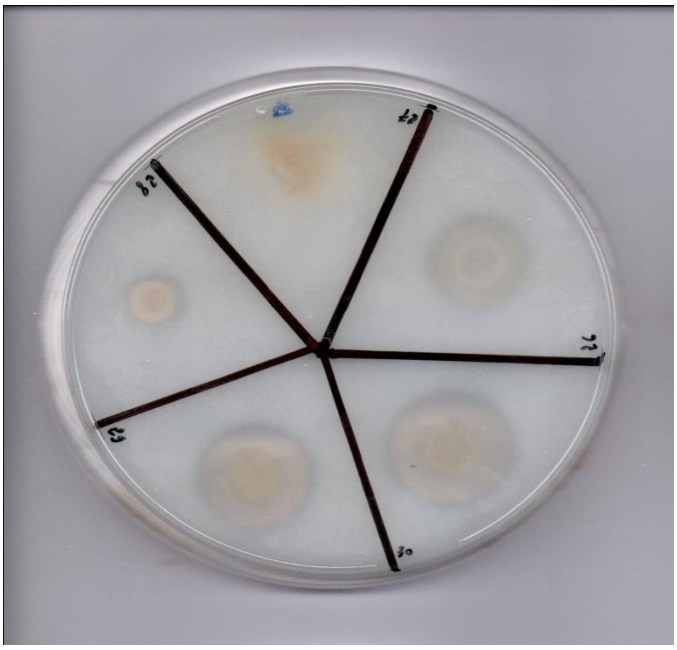


Figure 15-B: La variation du diamètre de l' halo sur le milieu NBRIP.

1.3. Production de sidérophores

Le fer est un élément essentiel pour les organismes vivants, il rentre dans les processus tels que la respiration et la synthése de l'ADN. Il est abondant dans le sol et se présente sous forme d'oxydes de fer (Fe^{3+}) insoluble (Compant et *al.*, 2005), ce qu'il le rend souvent un facteur limitant pour la croissance à la fois des bactéries et des palntes .

Pour pallier à cette limitation, la plupart des microorganismes ont développé un mécanisme hautement spécifique afin de l'assimiler via la production de sidérophores qui dépend des caractéristiques du sol, de la concentration en oligo–éléments, notamment en fer, du pH du sol et de la disponibilité du carbone et de l'azote. . En plus de ces facteurs, certains métaux lourds, tels que le zinc et le cadmium semblent stimuler leur production. (Ramette et al., 2003).

Les sidérophores procurent une protection aux plantes contre plusieurs maladies fongiques ou bactériennes (Siddiqui et al., 2003), et cela est possible grâce à des composés qui inhibent la croissance des champignons phytopathogènes.

La capacité des isolats bactériens à produire les sédiropohre à été testés sur milieu CAS par le virage de la couleur du milieu du bleu vers l'orange avec l'apparition d'un halo autour des colonies bactériennes. Parmi les 73 souches isolées, 58 isolats, c'est-à-dire 79 % de la totalité des bactéries testées (Figure 16) ont montré un résultat positif.

Nos résultats sont en accord avec les travaux de Garcia-Gutiérrez et al. , (2012) qui ont rapporté que toutes les rhizobactéries d'orge sont capable de produire ces composés.

Des travaux qui ont été réalisé sur les isolats rhizosphérique du blé, ont montré une forte capacité de production des sidérophores (Bevivino et al., 1998 ; Luvizotto et al., 2010).

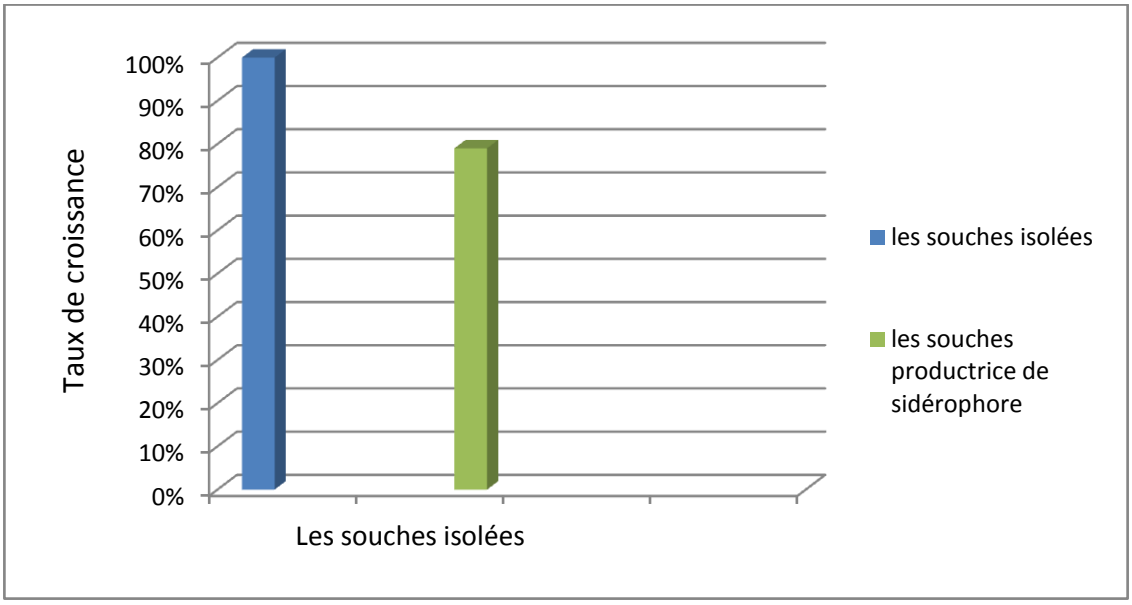


Figure 16 : La production de sidérophores chez les isolats rhizsphérique testés.

1.4. Production d'acide cyanhydrique:

Le cyanure ou l'acide cyanhydrique (HCN) est un redoutable produit chimique par ses propriétés toxiques. Il est synthétisé, excrété et métabolisé par des centaines d'organismes, y compris les bactéries, les algues, les champignons, les plantes et les insectes. Chez les bactéries d'intérêt agricole, il joue un rôle important comme agent biologique contre les pathogènes (Saharan et Nehra, 2011).

La production de l'HCN a été révélé par la formation de couleur rouge sur papier filtre imprégné d'acide picrique. La production du HCN était exprimée chez 100 % des isolats testés (Figure 17). Nos résultats rejoigne d'autre travaux, on peut citer les travaux de Kumar et al., 2014.

Des travaux antérieurs ont montré qu'envrion 80 % des rhizobatéries isolés à partir de pomme de terre et de blé étaient capable de produire de l'HCN (Bakker et Schippers.,1987) et selon Banerjee et al. , (2010) , Abbasi et al.,(2011) et Rana et al., (2011) les rhizobactéries de blé isolée du sol salin ont une meilleure capacité de produire l'HCN.

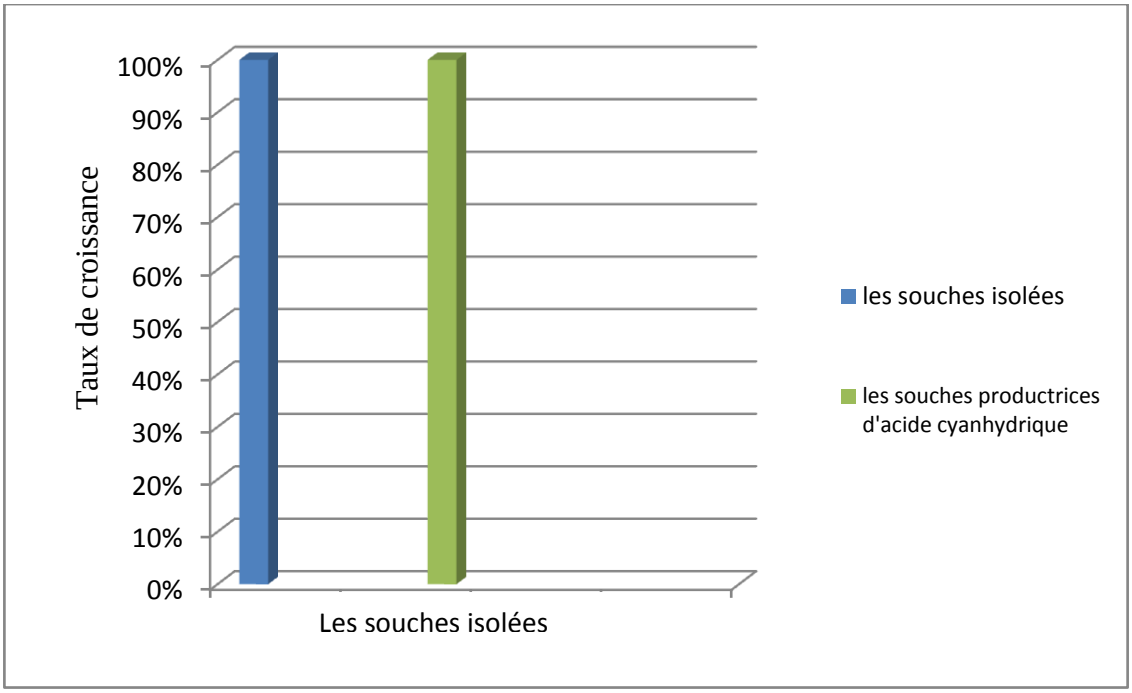


Figure 17 : la production d'HCN par les isolats rhizosphérique testés.

1.5. Production d'acide indole acétique:

Généralement, la majorité (>80 %) des bactéries du sol sont capables de secréter les auxines surtout l'acide indole acétique (AIA), l'acide indole butyrique ou d'autre composés similaires via le métabolisme du tryptophane (Ramos-Solano et *al*., 2010). L'AIA est une phytohormone connue pour être impliquée dans l'élongation de la racine, la division cellulaire et l'élargissement de la cellule (Salisbury, 1994).

Nos résultats indiquent (figure 18) que toutes les souches isolées à partir du sol rhizosphérique d'orge sont capables de produire l'AIA sur le milieu LBT ; aussi nous avons trouvé que 100 % des souches sont capable de produire l'AIA même en absence du précurseur (Tryptophane)

Ces résulats sont en accord avec les travaux de Chaihran et Lumyong (2011), qui ont constaté qu'environ 80 % des bactéries de la rhizosphére d'orge (Sahara Algérien) peuvent sécréter de l'AIA et les travaux de Chaihran et Lumyong (2011), qui ont constaté qu'environ 80% des bactéries de la rhizosphére de blé peunvent sécrété l'AIA. .Aussi d'autres chercheures, en l'occurren El-Taralilya et Sivasithamparamb (2006) et Tsavkelova et al. , (2006) ont trouvé que les microorganismes du sol de la région Djelfa ont la capacité de produire de l'AIA et de favoriser la croissance des plantes.

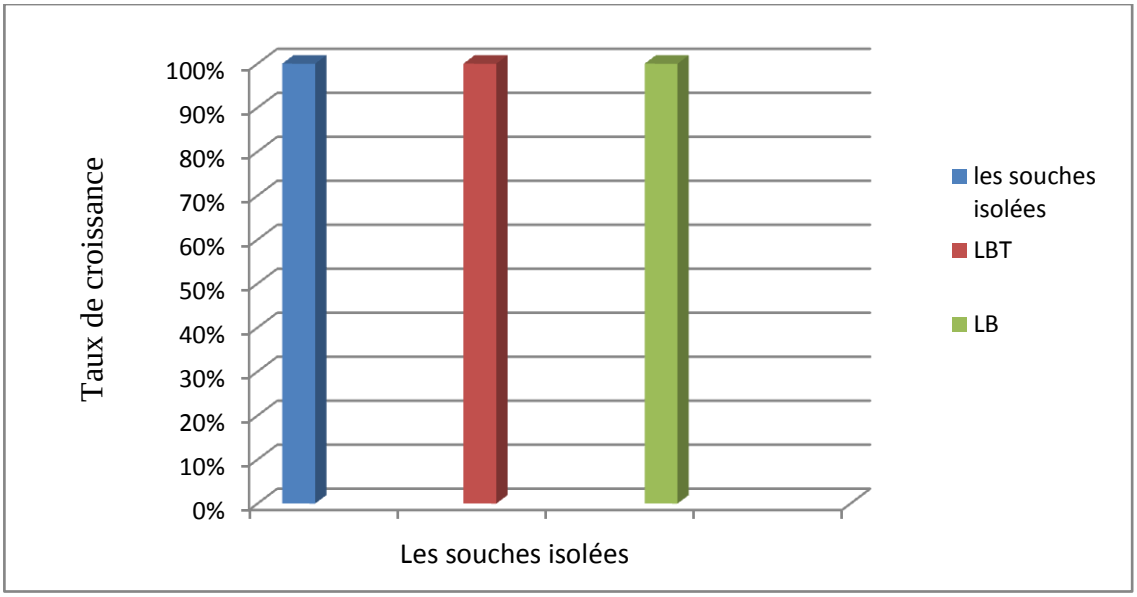


Figure 18 : la production d'AIA chez les isolats rhizosphérique testés**.**

2. Caractérisation phénotypique

La caractérisation phénotypique a été réalisé sur 58 souches rhizosphérique d'orge sur l'ensemble des 73 isolés ; les souches retenue sont ceux qui ont montré un résultat positif pour l'ensemble des tests utilisés à savoir la fixation d'azote moléculaire, la solubilisatuion de phosphate, la production des métabolites secondaire (AIA, HCN et sidérophores).

2.1 Étude microscopique

La coloration de Gram est la première étape utilisée dans la classification des bactéries, cette étape d'examen directe est essentiel pour apprécier la morphologie des germes et permet de les classer en deux grandes catégories (Gram + et Gram -)(Figure 19-A).

Des observations microscopiques réalisées sur des cellules fixées colorées par la technique de coloration de Gram, nous avons constaté que parmi les 58 isolats 44 isolats, un pourcentage de 75%, sont des bactéries Gram positif, tandis que les 25% restant sont des bactéries à Gram négatif. Concernant les deux groupe, nou avons trouvés une dominance de la forme cocci (55 % chez les Gram + et 18 % chez les Gram -), tandis que la forme bacille a été représenté par 20 % chez les Gram + et 7 % chez les Gram - (Figure 19-B).

Des résultats similaires ont été trouvé chez l'orge avec une prédominance de bactéries à Gram positif avec 78.45% du nombre total des rhizobactéries d'orge (Guibretière et al., 2008) et chez le blé, selon les études d'Amir et al.,(2005) montrent que la plupart des rhizobactéries ont caractérisés à gram positif.

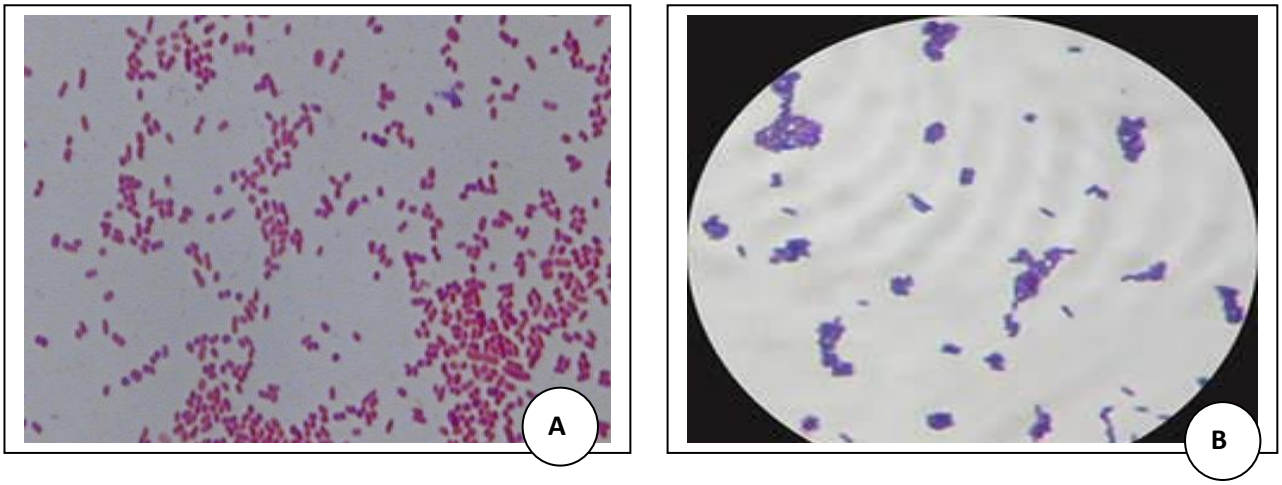


Figure 19-A : Observation microscopique des colonies Gram + (A) et Gram – (B) (G*100).

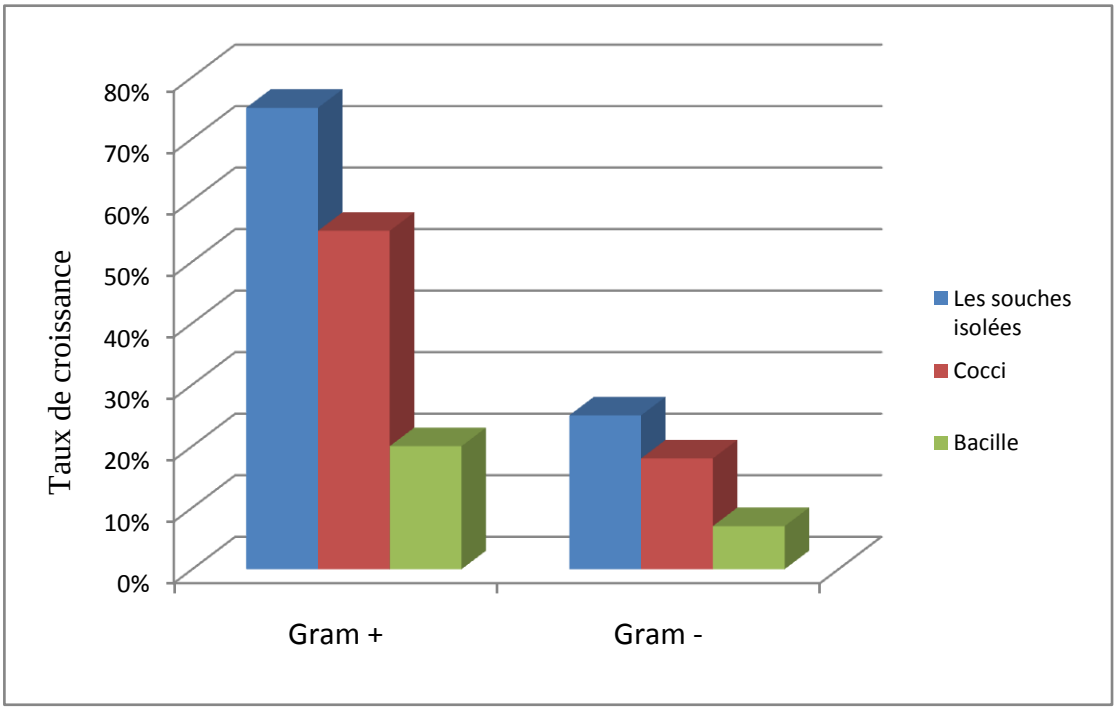


Figure 19- A : La diversité de Gram (Gram+ ou Gram-) et forme (Cocci ou Bacille) des isolats rhizsphérique testés.

2.2. Caractérisation physiologique

- **Tolérance à la température**

Nous avons étudié l'effet de la variation de la température chez les isolats testés, nous avons pour cela fixé 4 Températures : 4°C-28°C- 40°C- et 60°C.

Les 58 souches étudiées (100%) sont capable de croitre à une température de 28°C, donc la microflore de notre sol est de nature mésohpile.

Nos souches se sont montré capables de croitre à 40 °C et à 60°C soit un pourcentage de 100 %, ce résultats nous a permis de dire que la microflore de notre sol est de nature thermophiles. Aussi la prolifération de 96% des souches testés et à une température de 4°C indique que se sont des psychrophiles (Figure 20).

Il en résulte de ce test que la majorité des souches présentent une bonne thermotolérance tant aux basses qu'aux hautes températures. Les thermophiles présentent une variété d'adaptations cellulaires. En effet, leurs lipides membranaires contiennent des acides gras saturés et linéaires ce qui n'est pas le cas pour les mésophiles. Cela permet aux thermophiles de croître à des températures plus élevées en fournissant le bon degré de fluidité nécessaire pour le fonctionnement des membranes (Ulrih et al ., 2009).Dans plusieurs organismes, la thermotolérance est corrélée avec la production des protéines hsp (heatshockproteins) (Michiels et al.,1994), des protéines de poids moléculaire entre 38 et 68 KDa jouent un rôle important dans la protection des organismes contre le stress thermique (Abou-Shanab,2007).

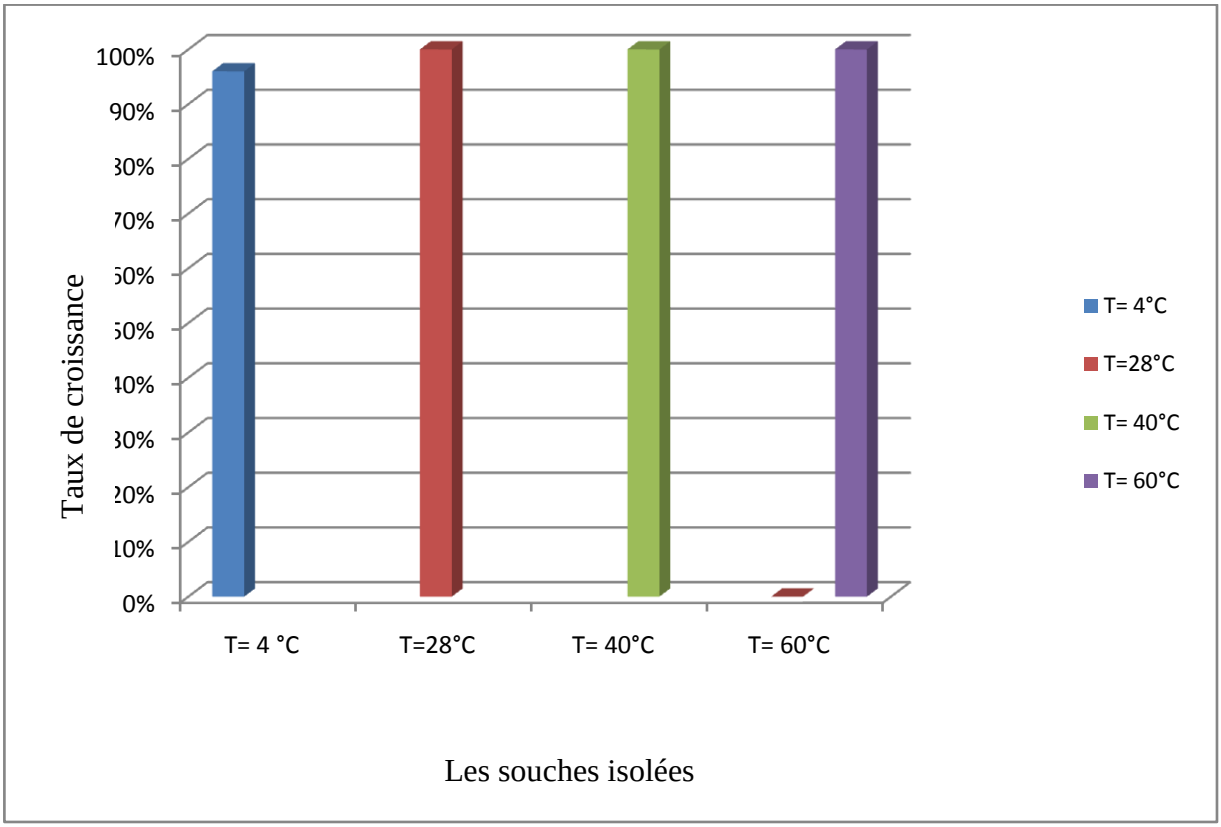


Figure 20 : Tolérance des isolats rhizsphérique testés à différentes températures.

- **Tolérance au pH**

Nous avons étudié l'effet de la variation de pH chez nos isolats, les 58 isolats étudiées montrent une prolifération de 100 % à pH 7, elles sont de cet effet considéré comme étant neutrophiles. 93 % des isolats sont capable de pousser à pH 10.

A pH 4 nous avons trouvées 75 % des isolats sont capable de se développer (Figure 21).

Les résultats obtenus indiquent que les isolats testés sont des alcalophiles ce qui est justifié par les caractéristiques physique du sol d'El Goléa qui possède un pH légèrement alcalin (8.7) (Boulahouache Et Gasmi, 2016). D'un autre côté, les travaux d'El Boutahiri et al., (2010) ont confirmé, en outre, que les rhizobactéries de la luzerne sont un peu sensibles aux pH acides (pH 4) et la plupart des souches tolèrent une acidité de pH= 5,5 à 6,0 et que leur croissance a augmenté en milieu alcalin. Ces résultats coïncident avec ceux de Satyanarayana et Johri (2005) et Blaainkov et al. (2010).

L'alcalinité est moins néfaste sur la survie des rhizobactéries. Jordan (1984) a montré que la majorité des bactéries peuvent tolérer des pH allant jusqu'à 9. Le même résultat a été retrouvé chez des souches nodulant les acacia (Zerhari et al., 2000) et le pois chiche (Mâatallah et al., 2002). Cependant, l'effet négatif que représente le pH alcalin du sol est l'indisponibilité des minéraux indispensables autant pour les bactéries que pour la plante hôte tel que le fer et le manganèse (Bordeleau and Prévost, 1994).

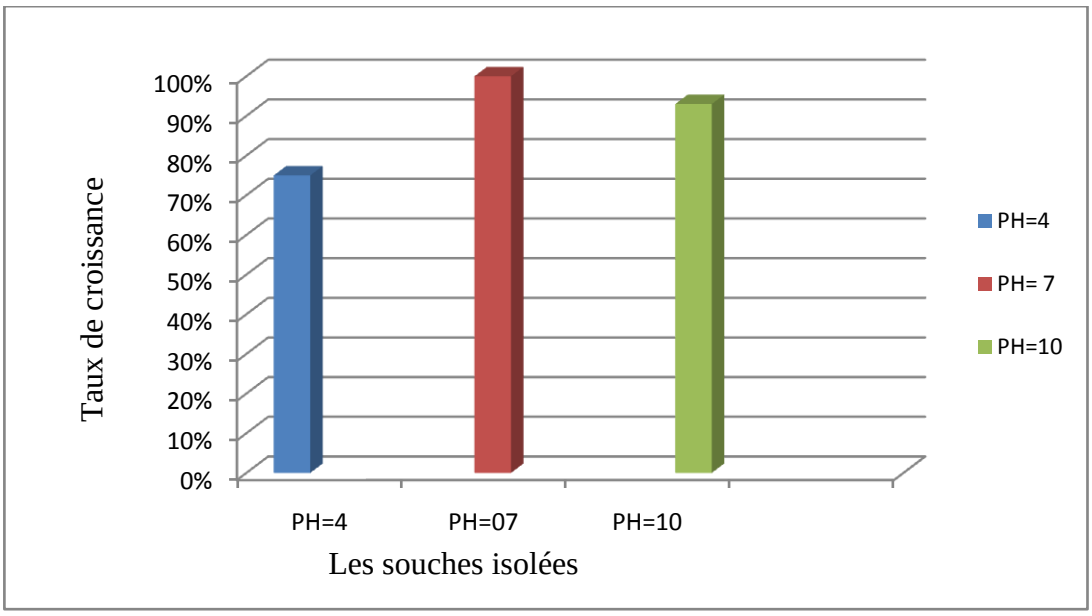


Figure 21 : Tolérance des isolats rizosphérique testés à différentes valeurs de pH.

- **Tolérance au stresse salin**

Afin de pouvoir tester la tolérance de nos souches aux sels, nous avons ajouté le NaCl à différentes concentration au milieu de culture. Après une incubation à 25°C pendant 24-48h, la totalité des souches montre une prolifération quel que soit la concentration du sel appliqué (Figure 22).

Les résultats que nous avons obtenus sont similaires avec les travaux de Silini-Cherif et al., (2002) qui ont démontré que la croissance de la rhizobactérie isolée du sol salin augmente à des

concentration de NaCl comprise entre 100 et 500 mM , ces travaux attestent que ces bactéries semblent avoir une forte tolérance au sel.

Plusieurs travaux ont signalé que les bactéries isolées des environnement arides ou salins sont capable de survivre à des concentrations salines inhibitrices par rapport à celle isolées d'habitats non salins (Hayat et al. , 2013).Selon Kushner (1978), beaucoup d'organismes marins sont des halophiles légers (avec 3%, p/v de NaCl en eau de mer). Les halophiles modérés se développent de façon optimale à 0,5-2,5M de NaCl et les halophiles extrêmes à 4,2M de NaCl. Ce qui nous a permis de considérer nos souches comme des halophiles modérés.

L'adaptation des bactéries à des fortes concentrations en sel est due à leur faculté de synthèse et d'accumulation intracellulaire des solutés compatibles qui ont un rôle d'osmorégulateurs et protecteurs contre les effets néfastes de la salinité et elle est aussi en relation avec leur capacité à produire des exopolysacharides qui forme une couche protectrice contre la dessiccation et le stress salin.

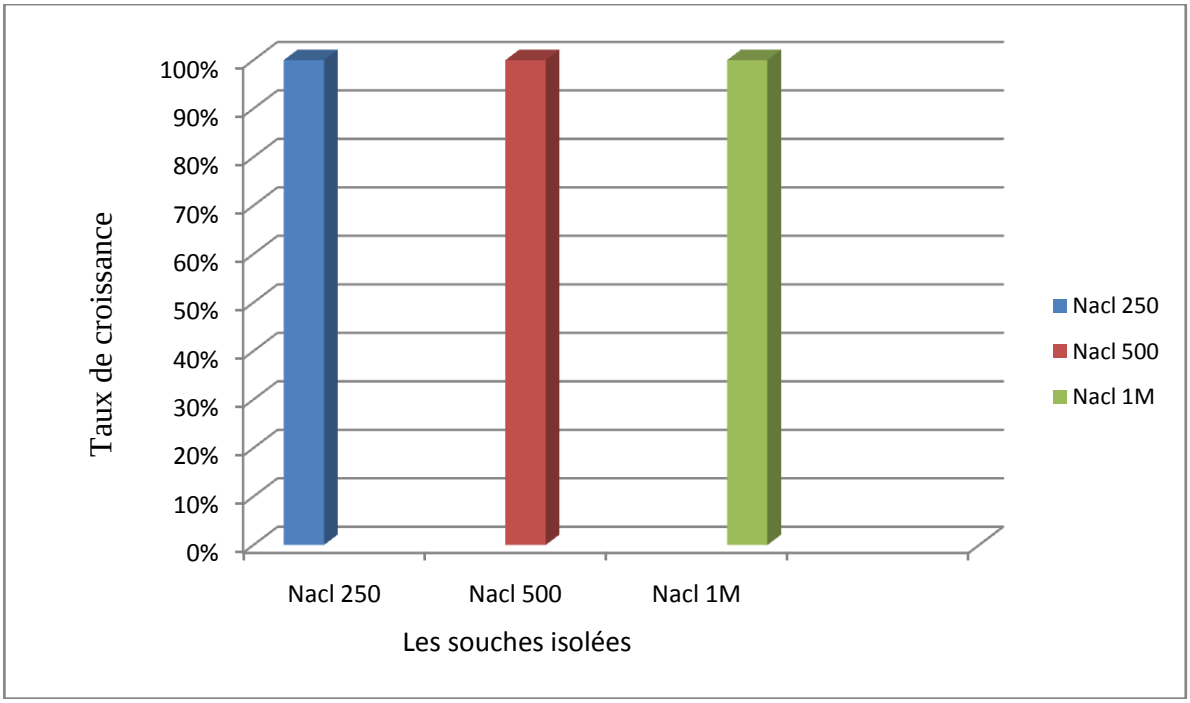


Figure 22 : Tolérance des isolats testés à différentes concentrations de Na Cl.

- **Tolérance au stress hydrique**

En réponse au déficit hydrique, les plantes augmentent la synthèse d'osmo protecteurs, permettant d'ajuster le potentiel hydrique dans les cellules et de détoxifier les cellules (Farooq et al., 2009). Il a été montré que certaines rhizobactéries peuvent intervenir dans ces réponses en synergie avec les réponses intrinsèques des plantes.

L'inoculation chez l'orge par des rhizobactéries, surproductrice de glycine-bétaïne, entraînent une amélioration de la résistance des plantes par une augmentation de la matière sèche foliaire et racinaire allant jusqu'à 80% (Yuwono et al., 2005).

Nous avons étudiés la croissance des isolats sous conditions de déficit hydrique, ce dernier a été créé en utilisant le polyéthylène glycol (PEG 6000) à différentes concentrations (10, 20 et 30g/l). Après une incubation à 25°C pendant 24-48h, la totalité des souches (Figure 23) ont donné un résultat positif avec les différentes concentrations de PEG.

Selon les études de Yurekli *et al*., (2003) sur la tolérance des rhizobactéries des céréales dans les zone arides ont montrés que ces bactéries ont une forte tolérance au différentes concntrations de PEG, cette tolérance aide la plante à résister à ce type de stress.

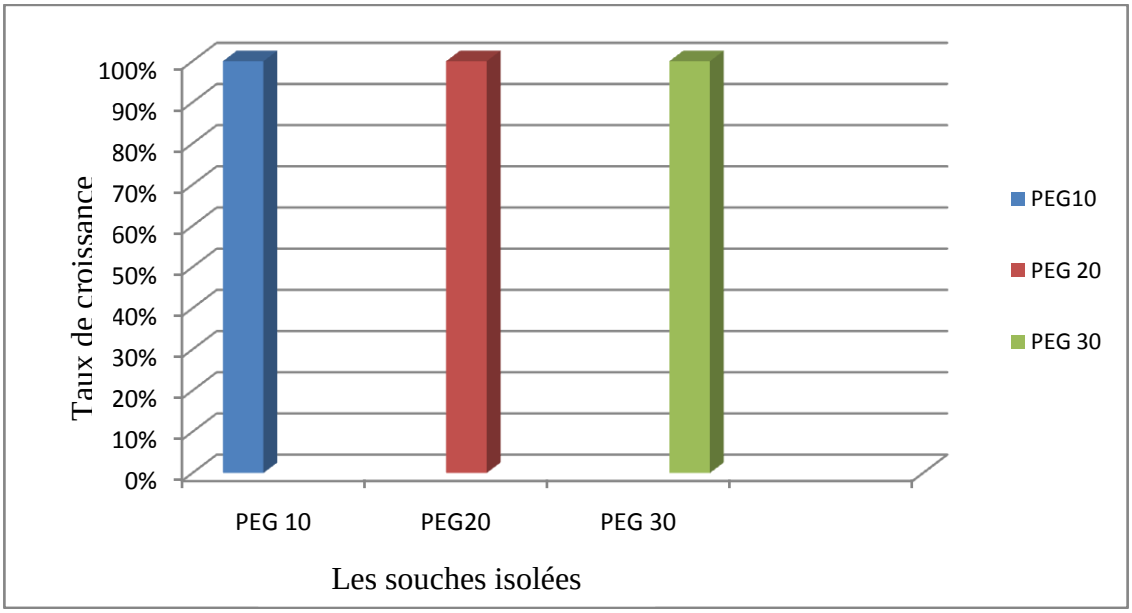


Figure 23: Croissance des isolats testés au TSA1/10 additionné de PEG 6000.

- **La résistance aux antibiotiques**

Pour les trois antibiotiques utilisés (Ampicilline , Amoxicilline , Lexine), presque la tolalité des isolats testés présente une forte résistance , nous avons trouvés 100 % des isolats sont capable de se croitre au présence d'Ampicilline et Amoxicilline à une concentration de 100mg/ml et 97 % des isolats sont résistantes au Lexine à une méme concentration , à une concentration de 200mg/ ml la résistance des souches vis-à-vis les antibiotiques s'est diminué un peu mais reste que plupart des souches étudiées se sont montrées résistantes à l'Ampicilline (88%), Amoxcilline (91%) et Lexine (78%) (Figure 24).

Nos résultats coincides avec les travaux de Velazquez et Rodriguez-Barrueco (2007), ils ont trouvé que les rhizobactéries des céréales des régions arides et sem-arides résistent à l'Ampicilline, et aussi les résulats obtenus par Sabzevar et Moghaddam (2012) qui ont montré

que certaines de leurs souches rhizosphéroque de blé (Région de Djelfa) étaient sensibles à Lexine.

La forte résistance de nos souches aux antibiotiques peut être expliquée par la présence de la matière organique issu de fécaux des animaux dans le substrat de la culture, ce qui nous conduit à supposer que cette résistance est acquise et non pas naturelle.

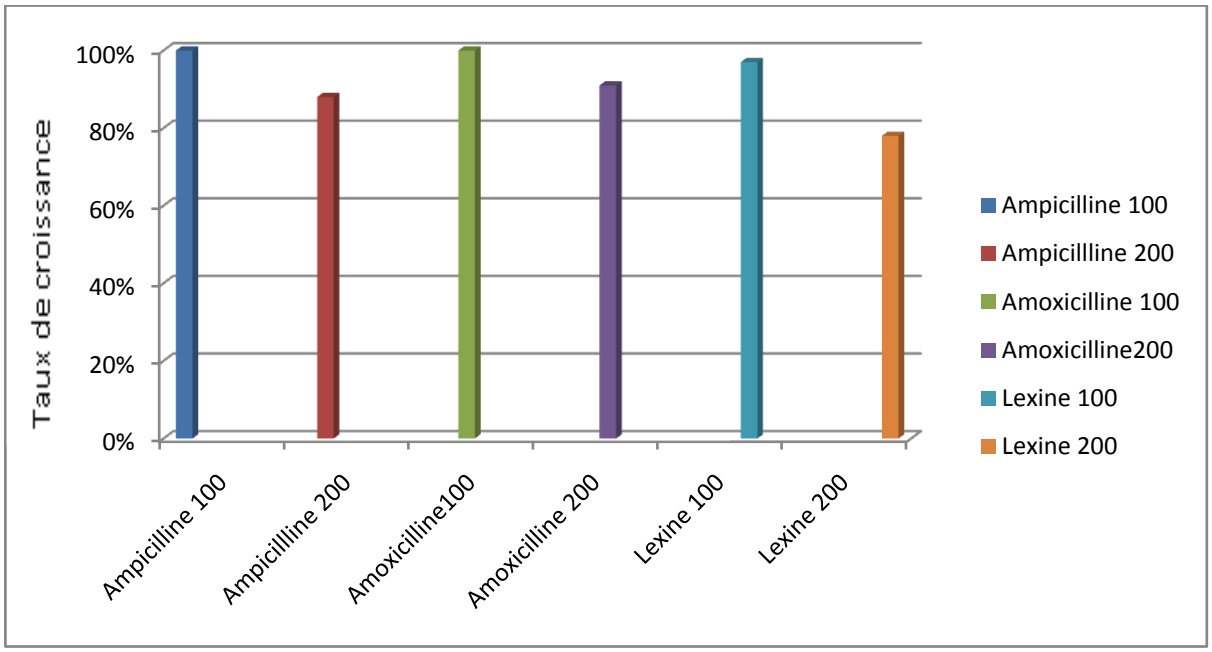


Figure 24 :la résistance des isolats rizosphérique testésaux différentes concentrations des antibiotiques

- **La résistance aux métaux lourds**

La résistance aux métaux lourds par nos isolats a été testée avec 3 métaux qui sont le Cuivre, le Zinc les carbonate de calcium à deux concentrations.

Les résultats (Figure 25) ont montré que 100% de nos isolats ont pu développer en présence des 3 métaux à une concentration de 100mg/ml , et la plupart des souches sont montré résistantes à une concentration de 200mg/ml de ces métaux lourds ,ce qui implique une résistance de nos isolats aux métaux lourds testés.

Ces résultats sont confirmés par les travaux de Kermanshahi et *al*. (2007) et qui ont révélé la tolérance de rhizobactéries aux métaux lourds (Zn2+, Cu2+, CaCo3).

Des travaux réalisés par Allen et al (1977) et Calomiris et al (1984) sur des souches bactériennes à Gram négatif et à Gram positif, ont montré l'association entre la résistance aux métaux (Hg2+, Cd2+, Zn2+, Cu2+, Pb2+, Sn2+ Al3+) et la résistance aux antibiotiques en utilisant la technique des répliques. Ils ont observé que la multi-tolérance au Cu2+, au Pb2+, et au Zn2+ est associée de manière significative aux germes multi-résistants aux antibiotiques mais pas aux germes sensibles.

Les mécanismes de résistance des bactéries aux métaux lourds sont très complexes. Ils consistent soit à la synthèse de protéines ou de polymères extracellulaires qui adhérent au métal, soit par compartimentation à l'intérieur des cellules et soit par le moyen le plus commun, la diminution de l'assimilation et l'activation de l'exportation (Ross, 1993 ; Tomsett, 1993). Comme chez toutes les bactéries, les gènes de résistance aux métaux lourds chez les rhizbactéries sont localisés au niveau des plasmides (Silver, 1992).

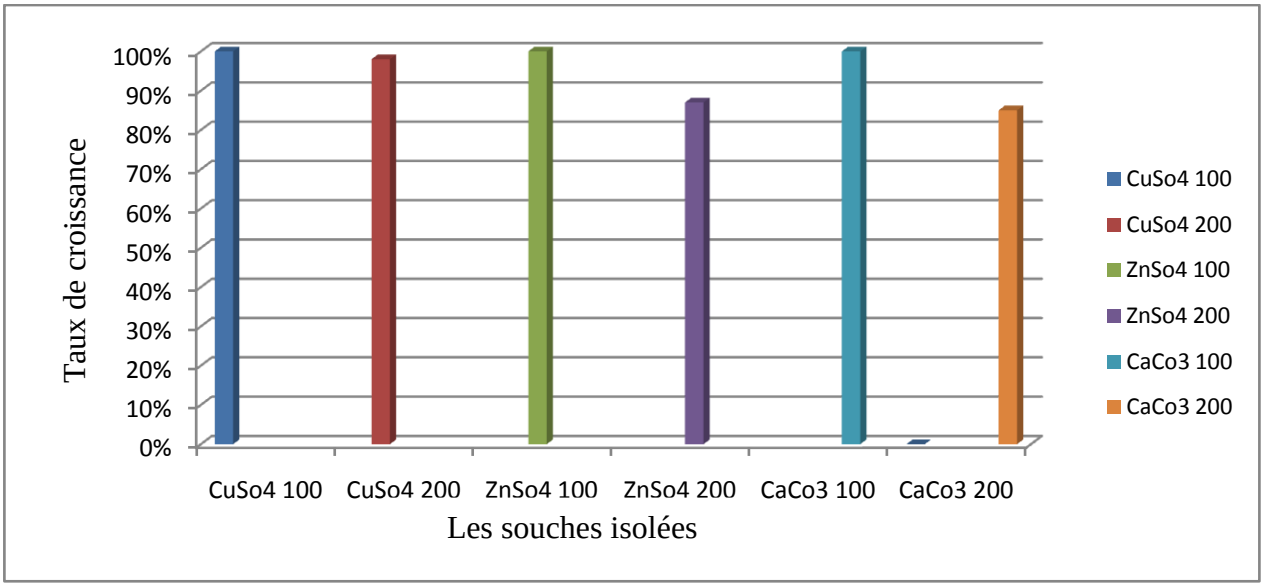


Figure 25: la résistance des isolats rhizosphérique à différentes concentrations des métaux lourds.

- **Les tets enzymatiques**

- **Catalase**

Concernant les tests des enzymes résperatoir, nous avons trouvés que la totalité de nos souches sont révélé catalase positive et seulement 6 souches qui ont une catalase négative (Figure 26), donc la majorité de nos souches se sont des aéro-anérobies ou des aérobies stricts.

- **Amylase**

L'amidon est un polymère de glucose qui constitue le glucide principal des graines, son hydrolyse est catalysée par l'amylase qui fournit le glucose, le maltose et les dextrines. Cette enzyme joue un rôle très important dans la germination pour la mobilisation des réserves et le développement de l'embryon (Singh, 1973).

Nos résultats sur la capacité des nos isolats à dégrader l'amidon ont montré que la totalité de nos souches ont une amylase positif (Figure 26).

La synthèse des enzymes amylasiques par les bactéries du sol permet une dégradation de la matière organique dans la nature en fournissant des éléments minéraux que les plantes exigent

pour leur croissance. Shonkor et *al.* (2011) ont montré que les rhizobactérie sont capables de produire des métabolites ayant un effet bénéfique sur la santé des plantes, les métabolites à activité antibiotiques (contre les phytopathogènes) et les enzymes extracellulaires (amylases, chitinases …etc.).

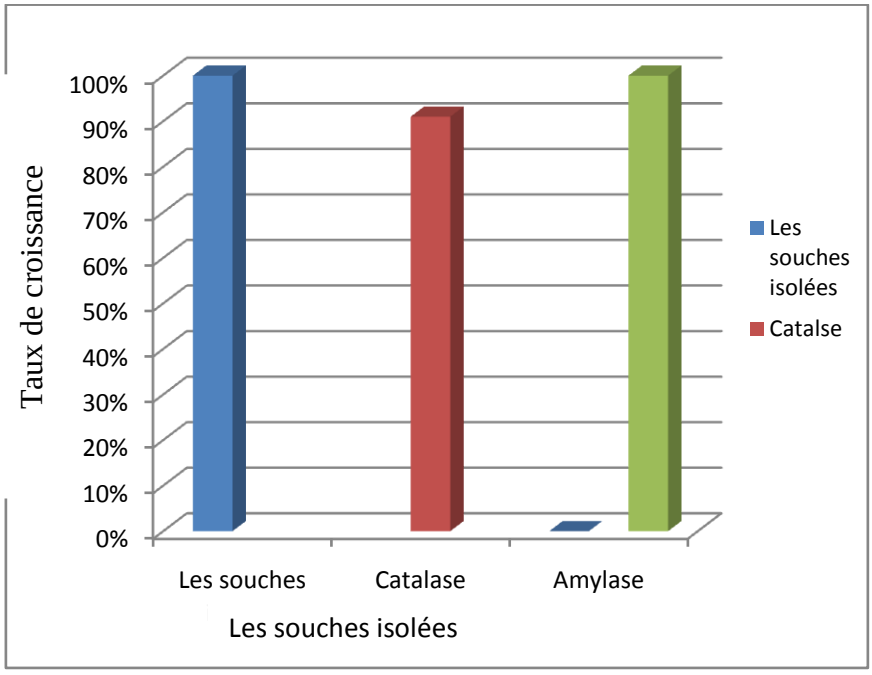


Figure 26 : Test des enzymes respiratoires des isolats rhizosphérique testés.

3. Effet de l'inoculation des bactéries P.G.P.R. sur la morphologie et le développement des plantes de la luzerne

L'étude de l'inoculation des bactéries a effet P.G.P.R sur la morphologie et le développement de la luzerne (*Medicago sativa* L.) a été testée avec les 58 isolats retenus pour la caractérisation phénotypique.

3.1. Germination et croissance

La germination des graines est définie par l'apparition de la radicule. Après une période de 4 jours d'incubation à l'obscurité nous avons constaté un effet positif de l'inoculum sur la germination de nos graines. La présence de stress que soit hydrique provoqué par le PEG6000 ou salin du à la présence des NaCl n'a pas montré d'effets à faibles concentrations, c'est à des concentrations de 30 g/l de PEG6000 et 250mM de NaCl que nous avons constaté un ralentissement dans la capacité germinatif de nos graines.

La différences dans la réponse des graines au stress salin ou/et hydrique suggèrent que le ralentissement de la germination des graines proviendrait de l'effet osmotique, le NaCl à forte concentration ne permettant pas l'entrée de l'eau dans la graine (Katemb et al. ,1998-Ungar IA ,1978), aussi sous les contraintes salines ou déficitaire, les réactions des graines ne dépendent pas seulement de l'effet du contrainte, l'intervention hormonale dans cette inhibition se conjuguant (Ackerson RC,1984-Debez A et al.,2001). Parmi les hormones de

croissance, on peut citer l'acide gibbérellique et l'acide abcissique (ABA), qui jouent un rôle important dans la germination, cet ABA agit en limitant l'absorption d'eau (Schopper P et al.,1979) et en inhibant la synthèse d'enzymes spécifiques de la germination (Black M,1983). A tous cela, on peut aussi ajouté l'incapacité des embryons à déclencher les fonctions métaboliques en présence de hautes concentrations en NaCl et PEG pour utiliser les produits de dégradations venant des réserves de l'albumen, ces métabolites en priorité des composés glucidiques et azotés, fonctionnerait comme des régulateurs osmotiques potentiels lors d'un stresse salin. (Bourdu R, 1983-Moreau RA et al., 1977-Kayani SA et al.,1990).

3.2. Paramètres biométriques

L'analyse des paramètres biométriques (la longuer-poids) a été réalisé après 28 Jours de croissance, les plantules de la luzerne ont été récupérées soigneusement à l'aide d'une pince puis déposés sur un papier pour faire l'objet de l'analyse de la longueur de la partie aérienne et la partie racinaire et leur biomasse fraiche.

- ✓ **Longueur**

La longueur de la partie racinaire et aérienne a été mesurée en absence et en présence d'inoculation. Les résultats obtenus (Tableau 03) montrent que les plantes de la luzerne inoculée par les souches testées en absence ou en présence de faible et moyen niveau de stress ont une longueur supérieure par rapport au témoin non inoculé. Aussi, les plus petites tailles ont été données par les plantules sous conditions de stress élevé.

Les résultats obtenus signifient que la concentration de l'inoculum est suffisant et que la présence des souches à effet PGPR peut éliminer l'effet d'un stress faible ou moyen et de tolérer les niveaux élevée de stress salin et hydrique. Aussi, les plantes qui ont une longueur inférieure par rapport au témoin peut être du à l'insuffisance de la concentration bactérienne de l'inoculum (1ml).

Tableau III : Résultats des analyses biométrique des plantules de la luzerne.

			Témoin	Témoin Inoculé	NaCl 75mM	NaCl 150mM	NaCl 300mM	10 g/l PEG	20g/l PEG	30g/l PEG
Paramètres biométrique	Taille (Cm)	Partie racinaire	2.78	3.21	3.04	2.94	2.80	3.18	3.03	2.93
		Partie aérienne	1.35	1.86	1.41	1.33	0.92	1.80	1.29	1.04
	Poids (g)	Partie racinaire	0.71	1.34	1.21	1.03	0.59	1.27	0.92	0.63
		Partie aérienne	0.27	0.32	0.29	0.28	0.18	0.3	0.23	0.21

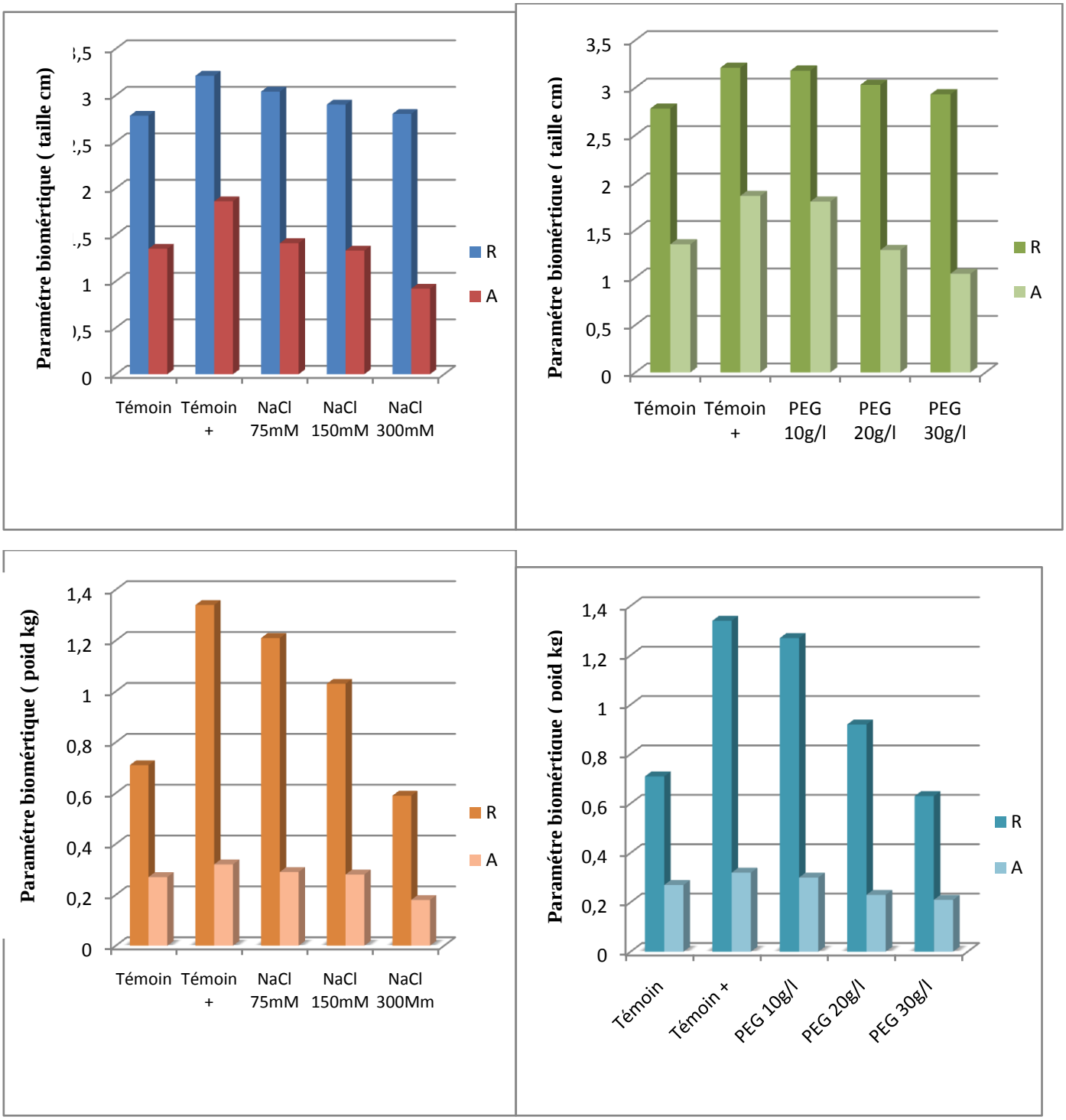


Figure 27 : Résultats des analyses biométrique des plantules de la luzerne.

- ✓ **Poids frais**

L'analyse des poids frais de la partie racinaire et la partie aérienne montre que l'inoculation par les souches augmente la masse pondérale fraiche de 18% et 89 % respectivement. Dans les conditions de stress salin et stress hydrique, le poids frais des parties souterraine et aérienne est supérieur à des niveaux faible et moyen de stress, mais à des concentrations élevées, le poids diminue par rapport au témoin non inoculé de 22% et 23% respectivement pour la partie racinaire sous stress hydrique et salin et de 33% et 44% pour la partie aérienne.

Les souches testées présentent un ensemble de caractéristiques qui permettent un meilleur développement des plantes, en effet la totalité des isolats ont la capacité de fixer d'azote, solubiliser le phosphate et de produire des hormones de croissance

3.3 Paramètres biochmiques

✓ **Teneur en chlorophylle**

Nos résultats (Tableau 04) montrent que les plantules inoculées par nos souches et qui n'ont pas été sujet de stress ont présenté des valeurs de 1.98ug/g de MVS pour le Chla et de 1.35ug/g de MVS pour le Chl b soit une augmentation de 7% pour Chl a et 34% pour le Chl b par rapport au témoin non inoculé.(Figure 27).

Dans les conditions de stress hydrique et salin, les plantules de *Medicago sativa* L. ont présentés des valeurs de Chl a et Chl b supérieur aux plantules témoins sans stress mais restent inférieur par rapport aux plantes inoculées non stressés.

Tableau IV :Résulats des valeurs de Chl et Chlb présenté par *Medicago sativa* L.

	Témoin	Témoin Inoculé	NaCl 75mM	NaCl 150mM	NaCl 300mM	10 g/l PEG	20g/l PEG	30g/l PEG
Chl a	1.84	1.98	1.95	1.92	1.88	1.98	1.95	1.90
Chl b	1.01	1.35	1.41	1.33	1.02	1.80	1.29	1.04

Nos résultats montrent que les plantules en déficit hydrique se caractérise par une diminution de leurs teneurs en chlorophylles (a et b), conformément à ce qui a été démontré par d'autres travaux chez l'orge (CHEIKH M'HAMED et Al.,2003) et chez le blé (TAHRI et Al.,1998).Selon Hireche, (2006) certaines plantes ont tendance à lutter contre le stress hydrique en baissant sa teneur en chlorophylle.

La chute des teneurs en chlorophylle est la conséquence de la réduction de l'ouverture des stomates visant à limiter les pertes en eau par évapotranspiration,la déshydratation, et par augmentation de la résistance à l'entrée du CO2 atmosphérique nécessaire à la photosynthèse (Bousba et *al.*, 2009).

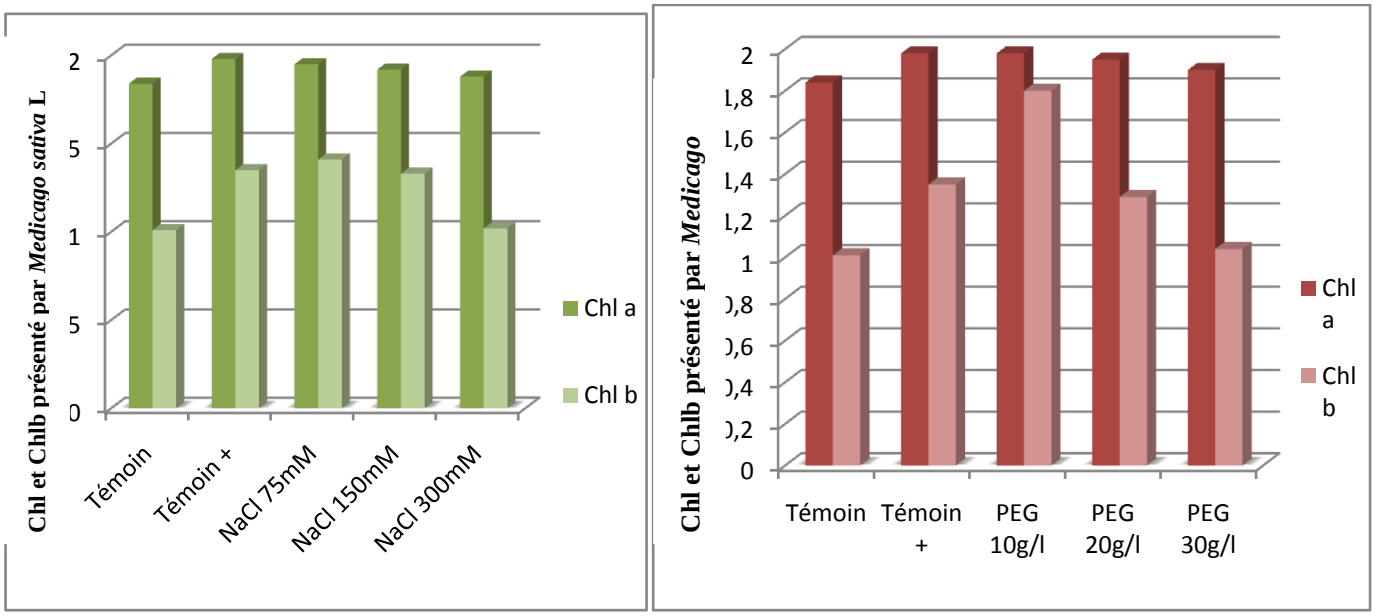


Figure 28 : Résulats des valeurs de Chl a et Chlb présenté par *Medicago sativa* L

✓ **Teneur en proline**

La teneur en protline donnée en ug/g de MVS est présentée par la figure 29. Les résultats obtenus montrent que la concentration des prolines est de l'ordre de 0.25 ug/g de M.V.S chez le témoin et augmente en présence d'inoculum à 0.47ug/g de MVS, cette augmentation diminue dans les conditions de stress mais reste supérieur au témoin.

Tableau 5: la concentration des prolines dans les conditions de stress .

	Témoin	Témoin Inoculé	NaCl	NaCl	NaCl	10 g/l PEG	20g/l PEG	30g/l PEG
Proline (ug/g)	0.25	0.47	0.41	0.38	0.27	0.45	0.42	0.30

Les résultats montrent une augmentation de la teneur en protéines totaux en présence de bactéries) éffet PGPR, au même temps réduction de la teneur moyenne en protéines totales dans les conditions de stress.Les teneurs en protéines des feuilles diminuent suite à un ralentissement de la synthèse du fait d'une diminution de l'activité de la nitrate réductase (Fresneau et al., 2007) ou de son niveau de transcription (Foyer et al., 1998).ou la dégradation des principales enzymes et protéines de la photosynthèse (Melis,1999 ; Teraza et *al.*,1999 ; Lawlor et Cornic ; 2002). Plusieurs auteurs ont montré que le stress entraine une baisse ou une

hausse des protéines totales selon les espèces (Rai et al., 1983 ; Kumar,1991).en effet, les résultats des travaux de Gnofam et *al* (2014) sur le cotonnier, et Akhzari et *al* (2015) sur le *Levisticum Officinale Koch* ont montré un déclin dans la teneur en protéines de manière proportionnelle à l'application de déficit hydrique.

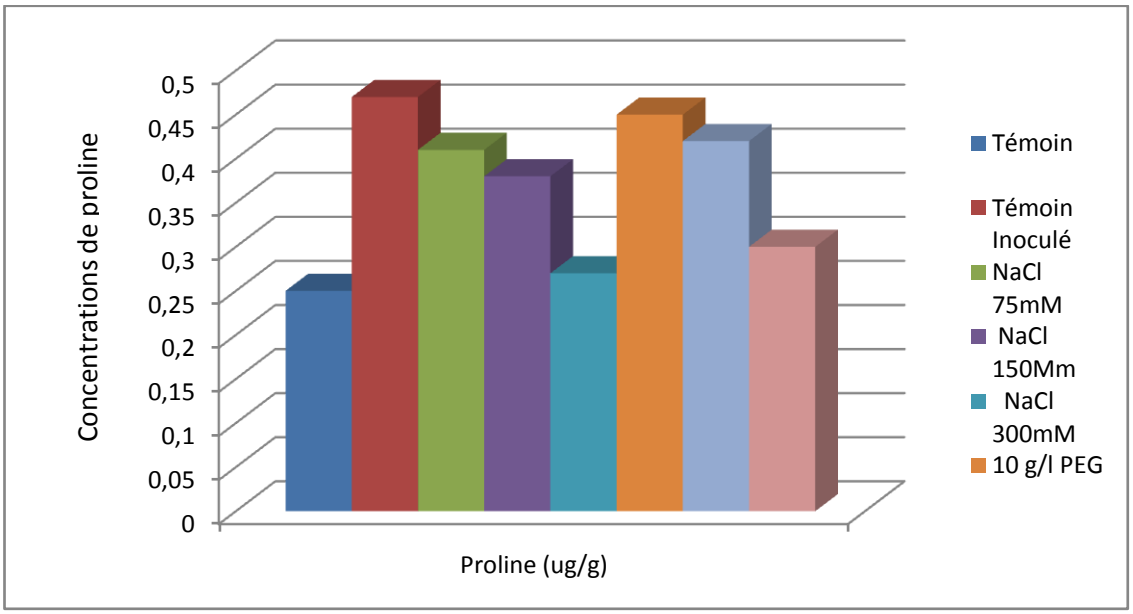


Figure 29 : Les différents concentrations des prolines dans les conditions de stress

Notre étude a pour objectif l'analyse qualitative et quantitative de la microflore rhizosphérique cultivable associée à l'orge (*Hordeum vulgarea* L.) cultivé dans la région d'El Goléa, une zone qui se caractérise par un sol salé et des températures élevées ce qui provoque un environnement stressé.

L'analyse métagénétique de la microflore rhizosphérique d'orge a montré une grande diversité et densité des populations bactériennes dont la plus grande partie est non cultivable ou non encore classé (inconnu).

A partir de la microflore bactérienne rhizosphérique d'orge cultivable nous avons isolé 73 souches qui ont montré une variation de forme, de couleur et de consistance.

La recherche de l'effet PGPR chez nos 73 isolats, a montré que la grande partie de nos isolats sont fixatrice d'azote atmosphérique (100%), 100% ont une capacité de solubiliser le phosphate , 100 % sont capable de synthétiser l'HCN et alors que 79 % présentent le pouvoir de produire les sidérophores. Cette capacité fonctionnelle et métabolique de nos souches reflète une forte adaptation aux conditions extrêmes d'El Goléa.

58 souches ont été choisies sur la base de leur pouvoir métabolique et ont été testé sur le plan morphologique, physiologique et biochimique. Nos résultats ont montré que nos souches manifestent des activités biochimique et physiologique intéressantes donc peuvent représenter des atouts naturels et réels si leur exploitation est conduite dans des conditions environnementales rigoureuses et que la valorisation de leurs potentialités s'oriente vers des applications biotechnologiques ciblées.

L'application de nos 58 souches sur les plantules de la luzerne dans des conditions de stress salin et hydrique a montré un effet positif sur la germination, la croissance des plantules et la tolérance à des niveaux élevées de stress.

Au terme de ce travail, plusieurs perspectives semblent nécessaires à réaliser :

- Réaliser des études moléculaires pour déterminer avec précision le statut taxonomique des isolats.

- Etudier le pouvoir des isolats à produire d'autres phytohormones (Cytokines, désaminase, gibbérellines,…) et procéder à la caractérisation d'autres activités enzymatiques (pectinases, lipases, chitinases,….).
- Faire des essais sur d'autres variétés d'une même plante et/ou d'autres plantes cultivées.
- Construire à partir des souches isolées, des combinaisons pour faire des inocula mixtes.
- Tester le pouvoir de chaque souche indiviuellement afin de déterminer leur potentiel d'utilisation.

Références bibliographique

Abnatura RD. (2013). Les Rhizobactéries PGPR. Bulletin Technique. Avril 2013 Issue. <http://www.abnatura.com/ESW/Files/abnatura_bulletin. (accessed 01.04.14).
Aggoussine, 2003. Protection against pathogen and salt stress by four plant growth-promoting rhizobacteria isolated from Pinus spp. on Arabidopsis thaliana. Phytopathol 98, 666–672.
Alabouvette C, Olivain C et Steinberg C. (2006). Biological control of plant diseases. The European situation. *European Journal of Plant Pathology*. **114,** 329–341.
Allens and Bartlett (2010). Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. Biol Fertil Soils. **12**, 39-45.
Albert P. 2001. The discovery, scope, and puzzle of desiccation tolerance in plants. Plant Ecology 151, 5–17.
Aubert, 1960. Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. *Z. A.Siddiqui (ed.), PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. p 1–38.
Aggoussine, 2003. Protection against pathogen and salt stress by four plant growth-promoting rhizobacteria isolated from Pinus spp. on Arabidopsis thaliana. Phytopathol 98, 666–672.

Baca BE et Elmerich C. (2007). Microbial Production of Plant Hormones. *Bacteria and Cyanobacterial Associations.* p.113-143.
Bursy*et (*2008) , Vargas *(*2008).** Life in acid: pH homeostasis in acidophilic, *Trends in Microbiology*, 15: 165-171.
Ben Naceur M., Rahmone C., Sdiri H., Meddahi M.L., Selmi M., 2001. Effet du stresssalin sur la germination, la croissance et la production en de quelques variétés maghrébines de blé. Secheresse. Vol. 3, 167-174.
Blum A., 1996. Crop responses to drought and the interpretation of adaptation plant growth regulation. **20**: 135 - 148 p.
Bohnert HJ, Nelson DE, Jensen RG. 1995. Adaptations to environmental stresses. The Plant Cell 7, 1099– 1111.
Braudeau E, Hachicha M. Guide du suivi de la salinisation des eaux et du sol : projet d'irrigation de la basse vallée de la medjerda et de Ras Djebel. *Sols de Tunisie. Bulletin de la direction des sols, n° 18.* Édit. : Direction des sols. Ministère de l'Agriculture de Tunisie, 1998 ; 249 p.

Cardon Z.G. (2007). The rhizosphere an ecological perspective. Elsevier Academic PressCalifornia , 1st Edition,231 p.
Carvalho I, Faria T and Pinheiro C (2002) How plants cope with water stress in the field. Photosynthesis and growth. Annals of Botany 89: 907-916
Cakmakci (2006). Cahier de références techniques. Micropropagation pour l'entreprise serricole. 53p

De Salamon IG, Hynes RK et Nelson LM. (2005). Role of Cytokinins in plant growth promotion by rhizosphère bacteria. In Siddiqui A. A. (ed.), PGPR : Biocontrol and Biofertilization. P. 173-195.

Debaeke P., Cabelguenne M., Casals ML. & Puech J., 1996. Élaboration du rendement du blé d'hiver en conditions de déficit hydrique. II. Mise au point et test d'un modèle de simulation de la culture de blé d'hiver en conditions d'alimentation hydrique et azotée variées. Epicphase-blé. *Agronomie*.**16**: 25 - 46 p.
Dick WA., Cheng L. and Wang P. **(2000)**. Soil acid and alkaline phosphatase activity as Ph adjustment indicators. *Soil Biol Biochem.* **32**, 1915–1919.
D'Amico (2006). Plant-rhizobacteria interactions alleviate abiotic stressconditions. Plant Cell & Environment 32: 1682-1694
Dommerrgues et Mangenot (1970) .Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. Plant Soil 212: 155-164.
Echigo et *(*2005).Plant Growth Promoting Properties of Rhizobacteria Isolated from Wheat and Pea Grown in Loamy Sand Soil. *Turk J Biol* .**32,** 9-15.
Ernez M. Lannoye R., 1991. Quantification des désordres photosynthétiques chez la plante stressée: aspects conceptuels et méthodologiques, L'amélioration des plantes pour l'adaptation aux milieux arides. Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris : 9-23.

Farooq M, Wahid A, Kobayashi N, Fujita D and Basra SMA (2009) Plant drought stress: effects, mechanisms and management. Agron. Sustain. Dev. 29: 185–212
Fernando WGD, Nakkeeran S et Zhang Y. (2005). Biosynthesis of Antibiotics by PGPR and its relation in Biocontrol of Plant Diseases. *In* Siddiqui Z. A. (ed.), PGPR : *Biocontrol and Biofertilization.* P. 67-109.

Garg AK, Kim JK, Owens TG, Ranwala AP, Choi YD, Kochian LV and Ray JW. (2002) Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 15898–15903
Granier C, Aguirrezabal L, Chenu K, Cookson SJ, Dauzat M, Hamard P, Thioux JJ, Rolland G, Bouchier-Combaud S, Lebaudy A, Muller B, Simonneau T and Tardieu F (2006) PHENOPSIS, an automated platform for reproducible phenotyping of plant responses to soil water deficit in *Arabidopsis thaliana* permitted the identification of an accession with low sensitivity to soil water deficit. New Phytologist 169: 623-635
Glick BR. 2007. Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase. Crit. Rev. Plant Sci. 26, 227– 242.

Kawahara (2008). Plant Growth Promoting Properties of Rhizobacteria Isolated from Wheat and Pea Grown in Loamy Sand Soil. *Turk J Biol* .**32,** 9-15.

Hamdali H, Hafidi M, Virolle MJ et Ouhdouch Y. (2008). Rock phosphate-solubilizing Actinomycetes: screening for plant growth-promoting activities. *World J Microbiol Biotechnol.* **24,** 2565–2575.

Irwin et Baird (2004). Identification of actinomycetes from plant rhizospheric soils with inhibitory activity against Colletotrichum spp., the causative agent of anthracnose disease. Intra et al. *BMC Research Notes*. **4,** p.98.

Irving GCJ et Cosgrove DJ .(1971). Inositol phosphate phosphatases of microbioligical origin .Some ome properties of a partially purified bacterial(*Pseudomonas sp*) phytase. *Aust. J. biol. Sci*. **24**, 547-57.

Jaradat Z, Dawagreh A, Ababneh Q et Saadoun I. (2008). Influence of Culture Conditions on Cellulase Production by *Streptomyces* sp. (Strain J2). *Jordan Journal of Biological Sciences.* **1,** 141- 146.
Ji SH , Gururani MA et Chul CS. (2014). Isolation and characterization of plant growthpromoting endophyticdiazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. *MicrobiologicalResearch*. **169**, 83– 98.

Karnwal A. (2009). Production of indole acetic acid by fluorescent *Pseudomonas* in the presence of L-Tryptophan and rice root exudates. *J. Plant Pathol.* **91,** 61-63.
Kemeli, A., and Losel, D.M., 1996. Growth and sugar accumulation in durum wheat under water stress. New phytol. 132: 57-62.**KENNY L., 1998.** Application de la culture *in vitro* à la multiplication des arbres et arbustes de zones arides, Colloque international sur les ressources végétales « l‟arganier et les plantes des zones arides et semi-arides », Agadir 23, 24 et 25 avril.

Lanyi (1974).Les plantes face au stress salin. *Cah. Agric*. **4**, p. 263–273.
Lester (2007). Genus Medicago (Leguminosae). A Taxogenetic study. The Hague, Boston, London., 228 p.
Lewinson (2004). Les plantes face au stress salin. *Cahier d'agriculture*. (4): 263-273

Mahajan, S., N. Tuteja. 2005. Cold, salinity and drought stresses: an overview. Archives Biochem and Biophysic., 444: 139-158.

Michaud, R., Lehman, W. F., et Rumbauch, M. D., 1988. World distribution and historical development. *Dans :* Alfalfa and Alfalfa improvement, Hanson, A. A., D. K. Barnes, etR. R. Hill *eds.*, 25-91.
Munns, R., R.A. James, A. Lauchli. 2006. Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. J. Exp. Bot., 27: 1025- 1043

Madigan et Martino(2006). Biological costs and benefits to plant– microbe interactions in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*.**56** : 1729- 1739.

Oren (1999). Growth and sugar accumulation in durum wheat under water stress. New phytol. 132: 57-62.
Oulbachir (1997). Composition des communautés bactériennes dénitrifiantes au sein d'un aquifère alluvial et facteurs contrôlant leur structuration: relation entre structure des communautés et dénitrification, Thèse doctorat, Université de Toulouse, 255 p.

Petit J et Jobin P. (2005). La fertilisation organique des cultures *Les bases.* Fédération d'agriculture biologique du Québec. Bibliothèque national de Canada, 48p.
Phadtare (2004) Plant growth –promoting rhizobacteria. *Plant-Associated Bacteria*, *p*195–230.

Rinvkind (1969). Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. Aust.J.Plant Physiol. **28**, 897-906.

Sasson, 1987 .Découverte d‟un nouveau mécanisme de tolérance des plantes au sel. UMR Biochimie et physiologie moléculaire des plantes (Unité mixte Ecole nationale supérieure agronomique de Montpellier /Université/CNRS/ INRA) Service Presse INRA. 34p.

Satyanarayana (2005). Les grandes productions végétales : céréales, plantes sarclées, prairies. Sainte-Gemme-sur-Loire, Sciences et Techniques Agricoles.
Soltner (2003). Karabi (2010). Recherches sur la microbiologie des sols désertiques. Ed. Paul Le Chevalier, Paris, 127 p.

Thoma JA, Spradlin JE et Dygert S. (1971) .Plant and animal amylases. In: Boyer PD (ed) The enzymes, 5th edn. Academic, New York, pp 115–189.

Tiquia (2007). Virtual plants: modelling as a tool for the genomics of tolerance to water deficit. Trends in Plant Science, 8 : 9–14.

Ulrih (2009). Virtual plants: modelling as a tool for the genomics of tolerance to water deficit. Trends in Plant Science, 8 : 9–17.

V**incent (1970).** Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp. Bot*. **52**:487–511.

Yoon (2003). Effect of plant growth promoting Rhizobacteria on seed germination and plant growth Chickpea (*Cicer arietinum* L.) under in *Vitro* conditions. *Biological Forum — An International Journal,* **2(**2): 15-18.
Yayanos (1979). Solubilization of inorganic calcium phosphates –solubilization mechanisms. *SoilBiol. Biochem*., **27**(3): 257-263.

Zahir ZA, Arshad M et Frankenberger WTJ. (2004). Plant growth promoting rhizobacteria : application and perspectives in agriculture. *Adv. Agro*. **81,** 97-198.

Annexe 01 : Appareillages et verreries

Appareillage	Verreries	Autre matériel
• **Autoclave** • **Bain marie** • **Balance électrique** • **Etuve** • **Réfrigérateur** • **Microscope optique** • **Ph-métre** • **Plaque chauffante**	• Becher • Boite de pétrie • Erlen-meyer • Fiole • Flacons • Lame et lamelles • Verre de montre	• Anses de platine • Papier aluminium • Pince en platine • Pissettes • Pendhoff • Spatule • Bec bunsen • Gants jetables • Marqueurs • Micro pipette • Portoir pour tube

Annexe2: Les compositions des solutions

L'eau physiologique 9%

NaCl	9g
L'eau distillé	1000ml

Antifongique

Terbinafine carbohydrtae	250 mg
Eau distillée	10 ml

Borate de sodium à 0.1N, pH 8.8

Borate de sodium	7.6g
Eau distillée	200ml

Réactif de Biorad

Bleu de Coomassie (G250)	0.01g
Ethanol 95 %	5ml
Acide phosphorique à 85%	10ml
Eau distillée	100ml

Solution picrate de sodium

Acide picrique	0,5g
Carbonate de sodium	20g

Solution de Salkowski

Acide perchlorique (35%)	60 ml
Solution de FeCl2 2% (0,5 M)	3 ml
Eau distillée	100ml

Solution de traces de métaux

Ca CO3	2mg
Zn So4	2mg
Cu SO4	1mg
Eau distillée	1000mL

Solution des antibiotiques

Ampicilline	1mg
Amoxicilline	1mg
Lexine	2mg
Eau distillée	1000mL

Annexe 3: Préparation et composition des milieux de culture pour 1litre

- ✓ **Technique de préparation.**

Pour chacun des milieux, les ingrédient sont pesés à l'aide d'une balance de précision et déposés dans une fiole jaugée puis rajouter le volume d'eau distillée à raison de 1000 ml.

Le pH est mesuré par un pH-mètre puis ajusté par l'ajout soit du KOH ou du HCl ensuite répartir dans des flacons de 250 ml et autoclavés à 115°C pendant 15 minutes, une fois refroidies (45°C), l'antifongique (Terbinafine carbohydrtae) est rajouté à raison de 5ml/l à l'aide d'un micro-filtre stérile de diamètre 0.22µm.

Jensen

CaCO3	2g
K2HPO4	1g
MgSO4.7H2O	0.5g
NaCl	0.5g
FeSO4.7H2O	0.1g
Na2MoO4.2H2O	0,005g
Glucose	20g
Agar	15g

LBT

Tryptone	10g
Extrait de levure	5g
NaCl	5g
L-tryptophane	1.02g
Agar	15g

NBRIP

Glucose	10g
Ca3(PO4)2	5g
(NH4)2SO4	0.1g
NaCl	0.2g
MgSO4.7H2O	0.25g
KCl	0.2g
Agar	15g

TSA à amidon 1%

TSB	3g
Amidon	10g
Agar	15g

TSA 1/10

TSB	3g
Agar	15g

Liste des tableaux

N °	Titre	Page
I	Nombre de reads qui représente les genres dominants dans le phylum Acidobacteria	**44**
II	Diamètre du halo de solubilisation du phosphate par les isolats rhizosphérique testés	**47**
III	Résultats de l'analyse biométrique des plantules de la luzerne.	**62**
IV	Résulats des valeurs de Chl et Chlb présenté par *Medicago sativa* L	**63**

Liste des figures

N °	Titre	Page
01	Développement racinaire du blé en situation de stress (A) ou normal (B), d'après Taiz et Zeiger (2006).	**12**
02	Classification des plantes selon leur niveau de tolérance à la salinité en fonction de la concentration en sel (Munns et Tester, 2008).	**15**
03	Réponses de la plante à la sécheresse. (A gauche, réponse à long terme; A droite, réponses à court terme)	**21**
04	Fonctionnement du complexe enzymatique « la nitrogénase ».	**23**
05	Rôles de l'AIA dans l'amélioration de la croissance des plantes (Khan *et al.,* 2009)	**26**
06	Mécanismes d'action des PGPR.	**29**
07	Localisation de la région de El Golea (A) et la zone d'expérimentation (B) en vue par satellite.	**30**
08	La mise en place de l'expérience de culture de l'orge dans la région de Ménéa avant (a)et après récolte (b).	**32**
09	Les étapes de traitement des échantillons d'orge au niveau de laboratoire.	**32**
10	Courbe d'étalonnage des protéines (BSA en µg/ml)	**41**
11	Classement des phylums abondants des Eubactéries dans les échantillons étudiés.	**43**
12	Pourcentage des classes des Protéobactéries.	**43**
13	Capacité de fixation d'azote par les isolats rhizosphérique isolée	**46**
14	La Solubilisation du phosphate des souches isolées exprimée par l'apparition d'une zone claire autour des colonies sur un milieu solide NBRIP (National Bota-nique Research Institute phosphate).	**48**
15-A	Diamètre du halo de solubilisation du phosphate par les souches rizoshpérique isolées	**48**
15-B	La variation du diamètre de l' halo sur le milieu NBRIP	**49**
16	La production de sidérophores chez les isolats rhizsphérique testés	**50**

17	La production d'HCN par les isolats rhizosphérique testés.	**51**
18	La production d'AIA chez les isolats rhizosphérique testés.	**52**
19-A	Observation microscopique des colonies Gram + (A) et Gram – (B) (G*100).	**53**
19-B	La diversité de Gram (Gram+ ou Gram-) et forme (Cocci ou Bacille) des isolats rhizsphérique testés.	**53**
20	Tolérance des isolats rhizsphérique testés à différentes températures	**54**
21	Tolérance des isolats rizosphérique testés à différentes valeurs de pH.	**55**
22	Tolérance des isolats testés à différentes concentrations de Na Cl.	**56**
23	Croissance des isolats testés au TSA1/10 additionné de PEG 6000	**57**
24	La résistance des isolats rizosphérique testésaux différentes concentrations des antibiotiques	**58**
25	La résistance des isolats rhizosphérique à différentes concentrations des métaux lourds.	**59**
26	Test des enzymes respiratoires des isolats rhizosphérique testés.	**60**
27	Résultats des analyses biométrique des plantules de la luzerne.	**63**
28	Résulats des valeurs de Chl a et Chlb présenté par *Medicago sativa* L	
29	Les différents concentrations des protéines dans les conditions de stress	**64**